

Naissa Maria Danielli

INDUÇÃO DE DEFESAS ANTIOXIDANTES EM OSTRAS *Crassostrea gigas*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

Coorientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis, março de 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Danielli, Naissa Maria
INDUÇÃO DE DEFESAS ANTIOXIDANTES EM OSTRAS
Crassostrea gigas / Naissa Maria Danielli ;
orientador, Alcir Luiz Dafre; coorientador, Afonso
Celso Dias Bainy Bainy - SC, 2017.
99 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

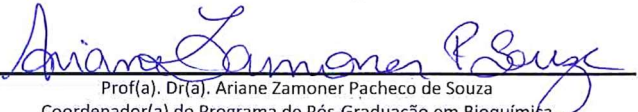
1. Bioquímica. 2. Crassostrea gigas. 3. Defesas
antioxidantes. 4. Via Nrf2/ARE. I. Dafre, Alcir
Luiz . II. Bainy, Afonso Celso Dias Bainy. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

"Indução de defesas antioxidantes em ostras Crassostrea gigas"

Por

Naissa Maria Danielli

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (11/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.


Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


Dr(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr(a) Risoleta Freire Marques (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Zenilda Laurita Bouzon (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Doris Sobral Marques Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Paulo Sérgio Martins de Carvalho (Universidade Federal de Pernambuco)
(VIDEOCONFERÊNCIA)


Dr(a) Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (Universidade Federal do Paraná)

Florianópolis, 07 de março de 2017.

Este trabalho é dedicado ao meu amor Julio Tancredo Kammers. Também a nossos pais, Ovidio, Carmen, Helio e Beatriz.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Alcir Luiz Dafre, agradeço-o pela paciência, confiança e dedicação em mim depositada. Agradeço também pelo exemplo de determinação e profissionalismo.

A Julio Tancredo Kammers, meu esposo, companheiro, motivo e ali-cerce; por estar ao meu lado, amando, acreditando e compartilhando os meus sonhos e dificuldades em todos os momentos.

Quero agradecer à minha família, o melhor presente. Aos meus pais, Ovidio e Carmen, pelo amor, exemplo, confiança e incentivo que sempre me ofereceram. Por serem a base de toda a minha vida, e terem me proporcionado as ferramentas para conquistar meus objetivos.

Aos meus novos pais, Helio e Beatriz, pelos ensinamentos, pelo apoio e pelas orações.

A todos os membros que já passaram ou estão no Labdef durante minha presença, em especial aqueles que auxiliaram diretamente na execução deste trabalho. Obrigada, Kelvis, Eduardo, Daiane, Luiz, Ariana, Vicente, Josimar, Leandro, Gabriela (técnica), Fernando.

A minha amiga Danielle Mello. Muitos foram os experimentos, as conversas, as experiências trocadas, agradeço pelo carinho e por tornar meus dias mais felizes. Muito, muito obrigada pela tua companhia e tua amizade!

Ao meu amigo Trevisan, pelas broncas (rsrsrs), insistência, momentos de diversão, por me ajudar e passar seus conhecimentos nos diversos momentos de meu doutoramento.

A Vanessa, minha IC preferida, pela amizade, ajuda, pelos desabafos e pela companhia.

A minha amiga Rafaela, mesmo longe, ainda me apoiava e me incentivava.

Aos Professores componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, que contribuíram para minha formação;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica;

À CAPES pelo auxílio financeiro;

A todos os colaboradores e amigos, que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida, meu muito obrigado.

RESUMO

Nrf2 (do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) é um fator de transcrição essencial para a indução coordenada dos genes que codificam enzimas de resposta ao estresse oxidativo, incluindo várias defesas antioxidantes e enzimas de biotransformação. Sua ação é dependente da ligação ao elemento de resposta antioxidante (ARE) na região promotora dos genes-alvo. A indução da via Nrf2/ARE oferece enorme potencial para a proteção antioxidante, no entanto, não há pesquisa sobre a ativação desta via em bivalves. Desta forma, o presente trabalho investigou a resposta antioxidante nas brânquias e glândula digestiva de ostras do Pacífico, *Crassostrea gigas*, tratadas com indutores da via Nrf2/ARE (curcumina ou tert-butilhidroquinona, tBHQ). Com a anotação do genoma da ostra *Crassostrea gigas* analisamos as regiões conservadas do gene do Nrf2 que revelou um domínio típico, a região *cap 'n' colar*. Os dados indicam que vários domínios, pertencentes ao modulador negativo do Nrf2 (Keap1, do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*), também estão conservados em moluscos. Nossos estudos indicam que Nrf2 e Keap1 são conservados em ostras, pois o Keap1 apresentou um alto grau de homologia nas espécies selecionadas de moluscos e vertebrados, incluindo a presença de cisteínas redox-sensíveis que são cruciais para sua função. A análise filogenética agrupou tanto o Nrf2 quanto o Keap1 de *C. gigas* juntamente com outras sequências de moluscos, mas separadas de vertebrados e artrópodes. As ostras *C. gigas* foram expostas a 10 ou 30 μM de curcumina ou tBHQ, ativadores clássicos da via Nrf2/ARE, porém o número de cópias de mRNA de Nrf2 e Keap1 não foram modulados na brânquia. Estes dados indicam que estes compostos não modularam transcricionalmente Nrf2 ou Keap1. Apesar deste resultado negativo, a principal forma de ativação do Nrf2 envolve a oxidação das cisteínas sensíveis de seu modulador negativo (Keap1), permitindo seu acúmulo e translocação para o núcleo. Desta forma, ao analisarmos a resposta antioxidante, pode ser observada uma clara indução de defesas antioxidantes nas brânquias, as quais são sabidamente controladas pelo Nrf2. Noventa e seis horas após o início do tratamento, os animais expostos à curcumina (10 e 30 μM), tiveram um aumento nos níveis de γ -glutamil-L-cisteinilglicina (GSH), e na atividade glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), e glutathiona S-transferase (GST). Por outro lado, a glândula digestiva não apresentou amplificação antioxidante. Os níveis relativos de mRNA que codificam para a enzima glutamato-cisteína ligase, GR, MDR3 e GST π foram claramente induzidos pelo tratamento com curcumina (30 μM , 24 h). O pré-tratamento com curcumina durante 96 h aumentou a sobrevivência

das ostras ao hidroperóxido de cumeno. Da mesma forma, ostras expostas à tBHQ por 96 h apresentaram um claro aumento nas defesas antioxidantes na brânquia e em menor intensidade na glândula digestiva. Esta resposta inclui aumento nos níveis de GSH, e na atividade GST, GPx e GR. Aumento na expressão do mRNA e proteína GR, também foram observadas após tratamento com tBHQ. Interessantemente, a diminuição na atividade GST, GPx e GR no início do tratamento (24 h) pode ser explicada pelo efeito inibitório da tBHQ ou de seus metabólitos. Esta conclusão é baseada na forte inibição *in vitro* da atividade GR, e em menor intensidade das atividades de GST e GPx. Apesar da ausência de aumento no mRNA do Nrf2, verificamos que: a) tanto o Nrf2 quanto o Keap1 são conservados filogeneticamente em bivalves; b) houve um aumento de defesas antioxidantes dependentes do Nrf2 após o tratamento com dois indutores clássicos do Nrf2 (curcumina ou tBHQ); c) houve uma clara modulação nos níveis de mRNA de vários genes alvos do Nrf2, e d) o tratamento com curcumina aumenta a resistência de ostras desafiadas com um oxidante. Em conjunto, estes dados indicam pela primeira vez a funcionalidade de Nrf2 em bivalves. Este trabalho apresenta novas informações sobre a via Nrf2/ARE em bivalves, as quais permitirão estudos mecanísticos relacionados as defesas antioxidantes e processos de biotransformação.

Palavras-chave: Nrf2. Keap1. ARE. Curcumina. tert-butilhidroquinona. *Crassostrea gigas*, Glutathione. Bivalves.

ABSTRACT

Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) is an essential transcription factor for the coordinated induction of genes encoding oxidative stress response enzymes, including several antioxidant defenses and biotransformation enzymes. Its action is dependent on the binding to the antioxidant response element (ARE) in the promoter region of the target genes. Induction of the Nrf2/ARE pathway offers enormous potential for antioxidant protection, however, there is no research on the activation of this pathway in bivalves. Thus, the present work investigated the antioxidant response in the gills and digestive gland of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, treated with inducers of the Nrf2/ARE pathway (curcumin or tert-butylhydroquinone, tBHQ). With the annotation of the genome of the *Crassostrea gigas* oyster we analyzed the conserved regions of the Nrf2 gene that revealed a typical domain, the cap 'n' colar region. The data indicate that several domains, belonging to the negative modulator of Nrf2 (Keap1), are also conserved in mollusks. Our studies indicate that Nrf2 and Keap1 are conserved in oysters because Keap1 presented a high degree of homology to selected species of molluscs and vertebrates, including the presence of redox-sensitive cysteines that are crucial for their function. Phylogenetic analysis grouped both the Nrf2 and Keap1 of *C. gigas* along with other mollusc sequences but separated from vertebrates and arthropods. *C. gigas* oysters were exposed to 10 or 30 μ M curcumin or tBHQ, classical activators of the Nrf2 / ARE pathway, but the number of mRNA copies of Nrf2 and Keap1 were not modulated in the gill. These data indicate that these compounds do not transcriptally modulate Nrf2 or Keap1. Despite this negative result, the main form of activation of Nrf2 involves the oxidation of the sensitive cysteines of its negative modulator (Keap1), allowing its accumulation and translocation to the nucleus. Thus, when analyzing the antioxidant response, a clear induction of antioxidant defenses can be observed in the gills, which are known to be controlled by Nrf2. Ninety-six hours after initiation of treatment, animals exposed to curcumin (10 and 30 μ M) had an increase in γ -glutamyl-L-cysteinyl glycine levels (GSH), and glutathione reductase (GR) activity, glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST). On the other hand, the digestive gland did not present antioxidant amplification. The relative levels of mRNA encoding glutamate-cysteine ligase, GR, MDR3 and GST π were clearly induced by curcumin treatment (30 μ M, 24 h). Curcumin pre-treatment for 96 h increased oyster survival to cumene hydroperoxide. Likewise, oysters exposed to tBHQ for 96 h showed a clear increase in antioxidant defenses in the gill and

lower intensity in the digestive gland. This response included increase in GSH levels, and in GST, GPx and GR activity. Increased mRNA and GR protein expression were also observed after treatment with tBHQ. Interestingly, the decrease in GST, GPx and GR activity at the start of treatment (24 h) may be explained by the inhibitory effect of tBHQ or its metabolites. This conclusion is based on the strong *in vitro* inhibition of GR activity, and on lower intensity of GST and GPx activity. Despite the lack of increase in the Nrf2 mRNA, we verified that: a) both Nrf2 and Keap1 are conserved phylogenetically in bivalves; B) there was a clear increase of Nrf2-dependent antioxidant defenses following treatment with two classic Nrf2 inducers (curcumin or tBHQ); C) there was a clear amplification at the mRNA level of various target genes of Nrf2, and d) curcumin treatment increased the resistance of oysters challenged with an oxidant. Together, these data indicate for the first time the functionality of Nrf2 in bivalves. This work presents new information about the Nrf2/ARE pathway in bivalves, which will allow mechanistic studies related to the antioxidant defenses and biotransformation processes.

Key-words: Nrf2. Keap1. ARE. Curcumin. tert-butylhydroquinone. *Crassostrea gigas*. Glutathione. Bivalves.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estrutura dos domínios do fator de transcrição Nrf2..... | 31 |
| Figura 2. Esquema geral para a indução da expressão de genes através da via de sinalização Nrf2/ARE..... | 32 |
| Figura 3. Curcumina na forma de ceto e enólica..... | 34 |
| Figura 4. Modelo interno e externo de <i>Crassostrea gigas</i> | 36 |
| Figura 5. (A) Análise do domínio conservado na sequência da proteína de Nrf2 de <i>Crassostrea gigas</i> . (B) Alinhamento múltiplo da região <i>cap 'n' colar</i> (CNC, caixa cinza) da sequência de proteína de Nrf2 de <i>C. gigas</i> e as proteínas Nrf1/Nrf2 de espécies selecionadas..... | 48 |
| Figura 6. Análises dos domínios conservados na sequência da proteína Keap1 de <i>Crassostrea gigas</i> (A) e na sequência da proteína Keap1 de espécies selecionadas (B)..... | 49 |
| Figura 7. Análise filogenética da proteína de Nrf2 de <i>Crassostrea gigas</i> e espécies selecionadas..... | 53 |
| Figura 8. Análise filogenética da proteína de Keap1 de <i>Crassostrea gigas</i> e espécies selecionadas..... | 54 |
| Figura 9. Equivalentes de curcumina (curcuminoides) na água do mar e tecidos de ostras <i>Crassostrea gigas</i> | 55 |
| Figura 10. Defesas antioxidantes nas brânquias e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a curcumina..... | 57 |
| Figura 11. Efeito da exposição à curcumina na expressão relativa dos genes selecionados em brânquias de ostras <i>Crassostrea gigas</i> | 59 |
| Figura 12. Efeito da exposição à curcumina na expressão relativa de Nrf2 e Keap1 em brânquias de <i>Crassostrea gigas</i> | 60 |
| Figura 13. O pré-tratamento com curcumina aumenta a taxa de sobrevivência das ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas à hidroperóxido de cumeno..... | 61 |
| Figura 14. Variação da absorbância na água do mar após a adição de tBHQ..... | 63 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 15. Defesas antioxidantes nas brânquias e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas à tBHQ..... | 64 |
| Figura 16. Efeito da exposição à tBHQ na expressão relativa do mRNA, na atividade e concentrações de proteína de enzima GR. | 66 |
| Figura 17. Teste de inibição enzimática <i>in vitro</i> por tBHQ..... | 67 |
| Figura 18. Efeito da exposição à tBHQ na expressão relativa dos genes Nrf2 e Keap1 nas brânquias das ostras <i>Crassostrea gigas</i> | 68 |
| Figura 19. Taxa de sobrevivência de ostras <i>Crassostrea gigas</i> pré-tratadas com tBHQ e expostas à hidróperóxido de cumeno..... | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Genes de interesse de ostras <i>Crassostrea gigas</i> e suas respectivas sequências de iniciadores para análises de RT-qPCR com base no banco de dados <i>GenBank</i> | 44 |
| Tabela 2. Análise de identidade e similaridade da sequência gênica e proteica do Nrf2 de <i>Crassostrea gigas</i> | 51 |
| Tabela 3. Análise de identidade e similaridade das regiões homólogas de Keap1 de <i>Crassostrea gigas</i> | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| aa | Aminoácido |
| AHR | Do inglês <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> |
| ANOVA | Análise de variância |
| ARE | Elemento de resposta antioxidante, do inglês <i>antioxidant response element</i> |
| ATF4 | Do inglês <i>Activation transcription factor 4</i> |
| β -Trcp | Do inglês <i>β-transducin repeat-containing protein</i> |
| BLAST | Algoritmo para comparação de sequências de aminoácidos e nucleotídeos utilizando alinhamento local; do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BLASTn | Busca em um banco de sequências nucleotídicas utilizando o algoritmo BLAST |
| BLASTp | Busca em um banco de sequências de aminoácidos utilizando o algoritmo BLAST |
| BTB | Do inglês <i>Tramtrack, and Bric à brac</i> |
| CDNB | 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno |
| CHP | Hidroperóxido de cumeno |
| Clustalw | Programa de alinhamento de sequências múltiplas |
| CNC | Do inglês <i>cap 'n' colar</i> |
| CUL3 | Ubiquitina ligase E3 |
| CUR | Curcumina |
| CYPxxx | Citocromo P450. xxx – número após a sigla representa a família à qual pertence a proteína |
| DGR | Do inglês <i>double glycine repeat</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNase | Desoxiribonuclease |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EIF-1 α | Fator de elongação 1- α |
| EPM | Erro padrão da média |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| <i>E</i> -value (ou <i>e</i>) | Probabilidade de duas sequências alinharem ao acaso |
| GAPDH | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase |
| GCL | Glutamato cisteína ligase |
| GenBank | Banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA; do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI) |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| GR | Glutathione reductase |
| GS- | Ânion tiolato da glutathione |
| GSH | Glutathione reduzida |
| GSH-t | Glutathione total |
| GSSG | Glutathione oxidada |
| GSTxx | Glutathione <i>S</i> -transferase. xx – letras após a sigla representa a família à qual pertence a isoformas |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HO-1 | Heme oxygenase 1 |
| HSP90 | Proteína de choque térmico 90 |
| IVR | Do inglês <i>Intervening Region</i> |
| JunD | Do inglês <i>Jun D Proto-Oncogene</i> |
| KEAP1 | Do inglês Kelch-like ECH-associated protein 1 |
| MDR | Proteína de resistência a múltiplas drogas |
| Mafs | Fator de transcrição bZIP Maf |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida |
| NQO1 | NADPH quinona oxidoreductase-1 |
| Nrf2 | Do inglês <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> |

| | |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| NS | Não significativo |
| pb | Pares de bases |
| RT-qPCR | Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real |
| PMF-1 | Proteína poliamina fator modulatório-1, do inglês <i>polyamine-modulated factor-1 protein</i> |
| SH | Sulfidrila |
| tBHQ | tert-butilhidroquinona |
| tBOOH | tert-butilhidroperóxido |
| TrxR | Tiorredoxina redutase |
| v/v | Volume/volume |
| w/v | Peso/volume; do inglês <i>weight/volume</i> |
| XAP2 | X - proteína 2 associada |
| XRE | Elemento de resposta a xenobióticos |
| $\Delta\Delta Ct$ | Método comparativo de Ct para quantificação relativa da transcrição do gene de interesse |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 1.1 | ESTRESSE ELETROFÍLITICO..... | 21 |
| 1.2 | ESTRESSE OXIDATIVO..... | 22 |
| 1.3 | DEFESAS ANTIOXIDANTES..... | 24 |
| 1.4 | PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTI- COS..... | 27 |
| 1.5 | REGULAÇÃO TRANSCRIONAL DAS DEFESAS CELULA- RES..... | 29 |
| 1.6 | CURCUMINA | 33 |
| 1.7 | TERT-BUTILHIDROQUINONA (tBHQ) | 35 |
| 1.8 | OSTRA COMO MODELO..... | 35 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 38 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 38 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 38 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODO..... | 39 |
| 3.1 | ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS..... | 39 |
| 3.2 | ANIMAIS E CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO..... | 39 |
| 3.3 | NÍVEIS DE EQUIVALENTES DE CURCUMINA NA ÁGUA DO MAR E NOS TECIDOS..... | 40 |
| 3.4 | NÍVEIS DE tBHQ NA ÁGUA DO MAR..... | 41 |
| 3.5 | ANÁLISES BIOQUÍMICAS..... | 41 |
| 3.6 | TESTE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA in vitro..... | 42 |
| 3.7 | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIP- TASE REVERSA EM TEMPO REAL (RT-qPCR) | 42 |
| 3.8 | ENSAIO DE RESISTÊNCIA AO ESTRESSE..... | 45 |
| 3.9 | WESTERN BLOT..... | 45 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.10 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 46 |
| 4 | RESULTADOS..... | 47 |
| 4.1 | ANÁLISES DE IDENTIDADE E FILOGENIA DE NRF2 E KEAP1 DE <i>Crassostrea gigas</i> | 47 |
| 4.2 | EFEITO DO TRATAMENTO COM CURCUMINA..... | 54 |
| 4.3 | EFEITOS DO TRATAMENTO COM tBHQ..... | 61 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 70 |
| 5.1 | TRATAMENTO COM CURCUMINA..... | 70 |
| 5.2 | TRATAMENTO COM TBHQ..... | 71 |
| 5.3 | RESPOSTA NAS BRÂNQUIAS..... | 74 |
| 5.4 | PAPEL DO KEAP1 E NRF2 NAS RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DE BIVALVES..... | 75 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 78 |
| | REFERÊNCIAS..... | 80 |
| | ANEXO A..... | 96 |
| | ANEXO A..... | 98 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE ELETROFÍLICO

O estresse celular pode ser causado por diversos fatores, dentre eles, estressores ambientais, tais como: temperatura, exposição às toxinas, radiações e danos mecânicos. Entre os mais estudados temos o estresse oxidativo e eletrofílico, por serem causadores de danos a biomoléculas. Por exemplo, proteínas, DNA e lipídios de membranas celulares podem ser afetados, desencadeando doenças e morte celular. Além disso, o estresse oxidativo pode levar à produção de moléculas eletrofílicas. Estas, por sua vez, podem levar à formação de moléculas oxidativas e consequente ao estresse oxidativo (BENEŠ et al., 2013; FULDA et al., 2010).

O estresse eletrofílico é causado por moléculas com centros de carbono eletrofílicos, os quais são deficientes em elétrons. Eles são altamente reativos pela sua interação com nucleófilos (moléculas capazes de doar elétrons), como tióis ou grupos sulfidrilas, que são encontrados em pequenas moléculas ou em resíduos de cisteína de proteínas. As substâncias eletrofílicas podem ser divididas em 3 classes de acordo com sua toxicidade: a primeira induz toxicidade levando à morte celular por esgotamento de GSH (glutathiona reduzida); a segunda leva a uma depleção moderada nos níveis de GSH, e a terceira resulta em uma diminuição nos níveis de GSH ainda menor que a segunda, mesmo assim, ainda é capaz de causar danos celulares (SATO; MCKERCHER; LIPTON, 2013).

Os compostos eletrofílicos possuem duas origens. Aqueles de origem exógena, como medicamentos, já são moléculas eletrofílicas ou podem ser convertidas a moléculas eletrofílicas pelo metabolismo celular. Como exemplo, o popular paracetamol, essencialmente metabolizado no fígado através de conjugação com ácido glucurônico e sulfato. Entretanto, alguns metabólitos são hepatotóxicos como a imina N-acetil-p-benzoquinona. Este metabólito tóxico leva ao consumo de glutathiona e dano celular, o que pode induzir a insuficiência hepática e necrose tubular renal (LEUNG et al., 2013; MAZALEUSKAYA et al., 2015). As moléculas eletrofílicas também são formadas endogenamente; um exemplo é a formação de um produto secundário do catabolismo do aminoácido tirosina, o fumaril-acetoacetato. Esta substância adquire um caráter eletrofílico por possuir uma carbonila α, β -insaturada, resultando na oxidação de açúcares e aminoácidos (ZIMNIAK, 2011).

O aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) são os maiores geradores de compostos eletrofílicos pelo metabolismo biológico. O processo chamado de lipoperoxidação, que ocorre pela oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (incluindo aqueles que compõem os fosfolipídios de membranas celulares) geram derivados eletrofílicos. Esses são formados a partir de reações em cadeia, iniciadas pela abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metil de um ácido graxo, e, consequentemente, levam à produção de compostos secundários altamente reativos, dentre eles: 4-hidroxinonenal, acroleína e malondialdeído. Eles podem ser citotóxicos e/ou genotóxicos, provocando danos mitocondriais e inibindo a ação de chaperonas, a síntese de DNA e de proteínas (BENEŠ et al., 2013; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Entretanto, alguns desses agentes eletrofílicos têm ação benéfica, dependendo de sua concentração. Várias moléculas eletrofílicas protegem a célula contra insultos oxidativos de uma maneira secundária, ativando as defesas antioxidantes por intermédio da via do Nrf2/ARE (do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/ Antioxidant response element*) (SATO; MCKERCHER; LIPTON, 2013).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

As ERO são moléculas reativas e radicais livres derivados do oxigênio molecular. Com a evolução dos seres aeróbicos, as células tiveram que lidar com a produção de ERO, moléculas formadas pelo metabolismo normal da célula. Existe um balanço homeostático entre a produção e degradação de ERO, porém, em várias condições fisiológicas ou de estresse pode haver um grande aumento em sua produção. O equilíbrio existente pode ser perturbado, levando ao aumento dos níveis de ERO e, consequentemente, exacerbando os danos em macromoléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios e DNA, o chamado de "estresse oxidativo" (CHEN; GUO; KONG, 2012; CUI et al., 2011).

ERO podem ser geradas por estresse causado em condições naturais como alterações de temperatura, níveis de oxigênio, salinidade, bem como por contaminantes, ou pelo processo de biotransformação destes (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Na maioria dos casos, as ERO são produtos de redução parcial do oxigênio molecular, formados na cadeia transportadora de elétrons, em reações enzimáticas e reações de auto-oxidação. Podem ser formados como intermediários em reações de oxidação catalisadas por centros metálicos de enzimas. Na cadeia respiratória mitocondrial, há um vazamento de elétrons, que ao ter oxigênio disponível como aceptor de elétrons, este facilmente os aceita, convertendo-se no

radical ânion superóxido. O retículo endoplasmático é uma organela envolvida no enovelamento de proteínas, mas também participa da produção de lipídios, em processos de detoxificação e no armazenamento de substâncias. O retículo endoplasmático também pode gerar moléculas reativas como subproduto de seu metabolismo, consequentemente, levando ao estresse oxidativo (YE et al., 2015).

Por serem moléculas com baixo peso molecular e terem um elétron desemparelhado, os radicais livres facilmente reagem com a maioria das biomoléculas, começando uma reação em cadeia de formação de outros radicais livres. Estes processos de redução geram subprodutos metabólicos como o radical ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos orgânicos, radical hidroxila, oxigênio singleto, entre outros. Estas ERO são consideradas tóxicas, podendo comprometer a integridade e funcionalidade celular (LUSHCHAK, 2011). Sua toxicidade depende do seu tempo de meia vida e de sua permeabilidade às membranas biológicas. O H_2O_2 é relativamente estável e permeável as membranas, podendo oxidar moléculas longe do local onde foi formado. No entanto, o radical hidroxila é rapidamente degradado por ser consideravelmente menos estável. Por esta razão, esse radical interage rapidamente com as biomoléculas mais próximas, o que impede sua difusão (CUI et al., 2011; HALLIWELL, 2006).

As ERO podem atuar como sinalizadores intracelulares, possibilitando o controle de vias metabólicas através da regulação redox. Além disto, não se pode esquecer da atuação das ERO na defesa contra infecções, onde após a ativação de fagócitos há elevada produção de ERO, especialmente dependente da ativação do complexo enzimático da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase. Complexo o qual leva à formação de moléculas citotóxicas para microrganismos, incluindo H_2O_2 , ácido hipocloroso, radical hidroxila e oxigênio singleto (CLARK, 1999; ZIMNIAK, 2011).

Embora as ERO sejam fundamentais para os processos biológicos normais, elas são potencialmente perigosas, podendo causar lesões celulares por peroxidação de lipídios, proteínas e danos aos ácidos nucleicos (RAY; HUANG; TSUJI, 2012). Estas alterações na homeostase celular desencadeiam uma resposta através da modulação de fatores de transcrição, canais de membrana e enzimas que participam do metabolismo celular. Algumas vias de sinalização possuem moduladores dependentes de cálcio e de fosforilação de proteínas, resultando na modulação da expressão de enzimas de proteção e de reparação, integrantes das defesas antioxidantes (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008).

1.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES

A oxidação biológica é um processo ao qual os organismos aeróbicos tiveram que se adaptar com as consequências inevitáveis da toxicidade do oxigênio. A partir do acúmulo de oxigênio na atmosfera, as defesas antioxidantes diversificadas para as novas situações, foram selecionadas ao longo da evolução. As estratégias de defesas para a neutralização dessas ERO envolvem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005).

Antioxidantes não enzimáticos auxiliam na manutenção da saúde e prevenção de doenças, agindo diretamente na neutralização de radicais livres e espécies não radicalares, ou, auxiliando o sistema enzimático como cofator. Ou seja: uma substância capaz de atrasar ou inibir de maneira eficaz a oxidação de biomoléculas, como proteínas, membranas e DNA. Os principais antioxidantes não enzimáticos são de origem dietética, entre os quais se destacam as vitaminas e seus precursores. Dentre esses antioxidantes temos: o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e carotenoides (um dos precursores da vitamina A) (BIANCHI; ANTUNES, 1999; TRACHOOTHAM et al., 2008).

A vitamina C ou ácido ascórbico é um captador de radicais livres que exibe atividade antioxidante. Ela modula o estado redox intracelular através da manutenção de compostos sulfidríla reduzidos por sua capacidade de doar elétrons, incluindo a glutatona, em seu estado reduzido. Além de atuar como agente redutor neutralizando ERO, tais como H_2O_2 , a vitamina C tem uma ação indireta como cofator para uma série de enzimas (LOBO et al., 2010; SIRMALI et al., 2014).

A vitamina E é formada por elementos chamados de tocoferóis e tocotrienos. Entre eles se destaca o α -tocoferol, que, por sua capacidade em doar átomo de hidrogênio, é considerado um bom antioxidante na fase lipídica das membranas celulares. Nessas membranas celulares, ela atua na proteção contra a lipoperoxidação, reagindo com os radicais lipídicos produzidos, tornando-os mais estáveis, evitando assim, a sua propagação. Com isto, o α -tocoferol interrompe ciclos de formação de peróxidos lipídicos e de radicais livres. Logo, o radical tocoferoxil é formado durante a ação antioxidante, mas, em seguida, é reduzido por outros antioxidantes tais como ácido ascórbico, retinol ou ubiquinol (PACKER; WEBER; RIMBACH, 2001; TRABER; ATKINSON, 2007).

Estruturalmente semelhantes à vitamina A, os carotenoides são um grupo de muitos compostos, mas apenas alguns têm atividade provitaminária A. A sua principal função em todos os organismos não fotossintéticos parece ser proteção. Os carotenoides são conhecidos por serem

muito eficientes na supressão física e química dos danos causados pelo oxigênio singlete. Dentre as principais reações de eliminação de radicais livres por carotenoides temos: transferência de elétrons entre o radical livre e carotenoides, resultando na formação de um radical cátion de carotenoide ou radical ânion carotenoide; união direta do radical com um carotenoide; e transferência de átomo de hidrogênio conduzindo a um radical neutro de carotenoide (FIEDOR; BURDA, 2014).

Além desses compostos, também temos o tripeptídeo γ -glutamil-L-cisteinilglicina (GSH) que age na manutenção do estado redox da célula, atuando contra a formação de ERO. A GSH é o tiol não proteico mais importante da célula. Pela presença de uma cisteína em sua forma reduzida, GSH contribui para a homeostase redox, metabolizando espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Em seu estado oxidado, forma pontes dissulfeto entre duas moléculas de GSH (GSSG). O resíduo de cisteína participa como agente redutor ou neutralizador das ERO. E por ser o tiol mais abundante na célula, a GSH é responsável por manter o ambiente redox na célula, dependendo de um equilíbrio entre seu estado reduzido e oxidado (GSH/GSSG), cuja relação tem uma proporção intracelular de 30:1 a 100:1 (COUTO; WOOD; BARBER, 2016).

O equilíbrio tiol-dissulfeto também pode ser influenciado pelos resíduos de cisteína de proteínas (NAUSER; KOPPENOL; SCHÖNEICH, 2015). Apesar da GSH ser o tiol de baixo peso molecular mais abundante, a modificação de tióis proteicos durante o estresse oxidativo são quantitativamente dominantes e, em alguns casos, estão presentes em uma concentração 20 vezes maior do que a GSH (REQUEJO et al., 2010). A cisteína é um aminoácido altamente conservado nas proteínas e, conseqüentemente, atua na sua estrutura e função. Além do papel na formação de pontes dissulfeto, que estabilizam a estrutura das proteínas, os tióis livres participam da modulação pós-transcricional de enzimas e vias de sinalização, conhecido como regulação redox (LEICHERT; JAKOB, 2004). Os tióis proteicos reativos podem atuar como antioxidantes celulares devido a sua grande abundância (REISCHL et al., 2007).

Os antioxidantes enzimáticos, por sua vez, são cruciais para neutralizar a toxicidade do oxigênio e complementam a capacidade antioxidante fornecida pelos antioxidantes não enzimáticos (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005). As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (GPx) (PAVLOVIĆ et al., 2010).

A enzima superóxido dismutase desempenha um papel fundamental na defesa contra o estresse oxidativo, removendo o radical superóxido por meio do processo de dismutação em oxigênio e H_2O_2 . O H_2O_2

produzido a partir deste processo é reduzido a oxigênio e água pela enzima catalase (HERMES-LIMA, 2004; JO; CHOI; CHOI, 2008). A catalase localiza-se em maior abundância nos peroxissomos. Ela contém um grupo heme que facilita a remoção de H_2O_2 . Por causa de sua ampla distribuição, conservação evolutiva e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio, é aceito que ela desempenha um importante papel em sistemas que evoluíram para permitir que os organismos vivam em ambientes aeróbicos (SCANDALIOS, 2005).

Outra importante enzima redutora é a GPx, que está na classe das peroxidases, com função na eliminação e inativação de peróxidos de hidrogênio e hidroperóxido lipídicos, protegendo, assim, a célula contra o estresse oxidativo. Em humanos e em alguns outros mamíferos foram encontrados 8 isoformas de GPx. Em invertebrados essa lista se repete, como em ostras da espécie *Crassostrea gigas*, onde também foram descritas 8 isoformas. Esta classificação é condicionada pela sua localização celular e especificidade pelo substrato dependente de seu sítio ativo abrigar uma selenocisteína ou apenas uma cisteína (KEGG BRITE, 2016; PASSAIA; MARGIS-PINHEIRO, 2015; ZHANG et al., 2016). A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos em água ou álcoois e para esta reação utiliza GSH. Quando a GPx utiliza GSH como cofator, gera GSSG como produto (HERMES-LIMA, 2004; JO; CHOI; CHOI, 2008; PASSAIA; MARGIS-PINHEIRO, 2015).

O papel das GPx tem sido bem documentado no sistema imune e antioxidante em muitos moluscos. Inferindo seu potencial para avaliar o estresse celular, além de sua ação, já descrita, na defesa contra a toxicidade de contaminantes. Podemos observar esse desempenho da GPx em um trabalho em que foi avaliada a resposta antioxidante frente a um insulto bacteriano em *C. gigas*. Fatores de análises de variância revelaram que o aumento na expressão de GPx foi influenciado por injeções de diferentes estirpes de *Vibrio*, num modo dependente do tempo, alcançando o seu pico em 3 a 12 h após o desafio. Os autores propõem que esta resposta pode servir para monitorar alterações precoces nas ostras em decorrência à infecção bacteriana (JINGJING et al., 2010; MENG et al., 2015).

Para a manutenção do ambiente redutor intracelular, a razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) precisa ser mantida. Para isto, é necessária a reciclagem de GSSG para GSH, que é catalisada pela enzima glutathiona redutase (GR) (HERMES-LIMA, 2004). GR é uma flavoenzima da família oxidoredutase piridina nucleotídeo-dissulfeto. Em eucariotos encontra-se no citoplasma e dentro de organelas, sendo que um único gene expressa tanto a enzima citosólica quanto mitocondrial (COUTO; WOOD; BARBER, 2016b).

Funcionalmente a GR tem três substratos: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida (NADPH), hídrion (H^+) e GSSG; e dois produtos: GSH e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma oxidada ($NADP^+$), com sua redução por NADPH e a transferência desses elétrons para GSSG, regenera a enzima oxidada, e liberando GSH. Assim, GR ajuda a manter um ambiente intracelular reduzido com baixos níveis de GSSG e altos de GSH, pois a manutenção de uma alta relação GSH/GSSG (>100) é um fator determinante para o bom funcionamento da célula (DEPONTE, 2013).

Assim como em mamíferos e outros animais, a GR possui a mesma função em bivalves, com sua capacidade de reduzir GSSG, potencialmente importante para a manutenção do estado redox. Com uma ação indireta no catabolismo de ERO, a atividade dessa enzima tem sido muito empregada em trabalhos de monitoramento ecotoxicológicos. O uso da GR como biomarcador abrange vários trabalhos que compreendem desse o estudo dos efeitos de metais, hidrocarboneto aromáticos policíclicos, fungicidas, bifenilas policloradas e misturas complexas de compostos (como esgoto sanitário), entre outros (FRANTZEN et al., 2016; MACÍAS-MAYORGA et al., 2015; MANDUZIO et al., 2005; TREVISAN et al., 2016).

1.4 PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

Além da proteção contra ERO, existem outros mecanismos de defesa da célula, os quais são responsáveis pela eliminação de xenobióticos. O metabolismo de biotransformação de xenobiótico previne os possíveis danos a serem causados pelos próprios compostos tóxicos. O processo conhecido como biotransformação de xenobióticos tem como princípio tornar as moléculas mais polares, biologicamente inativas e que possam ser mais facilmente excretadas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Através de estratégias como sequestro, limpeza e ligação, uma impressionante variedade de enzimas capazes de biotransformar xenobióticos evoluíram para uma ação catalítica protetora contra espécies químicas tóxicas, além de fármacos e poluidores ambientais. Este processo pode ser classificado em distintas fases: a primeira e a segunda fase estão envolvidas na transformação de xenobióticos lipofílicos em metabólitos mais polares, portanto mais solúveis em água, menos tóxicos e facilmente eliminados pela célula; e a terceira é a fase de excreção dos metabólitos e dos seus conjugados para fora da célula. Dentre as enzimas de fase I temos

uma família de proteínas microsossomais, conhecidas com sistema citocromo P450 (CYP), que têm atividade monoxigenase (adição de um átomo de oxigênio em um substrato). As reações de fase II consistem na conjugação de xenobióticos, ou de seus metabólitos, com moléculas orgânicas, tais como GSH, ácido UDP-glucurônico, sulfato, fosfato ou glicina, tornando-as mais hidrofílicas (SHEEHAN et al., 2001).

Uma das classes mais importantes, dentre as enzimas de fase II, é a das glutathione S-transferases (GST). A conjugação de GSH é formada pelo ataque nucleofílico do ânion tiolato da glutathione (GS^-) a um átomo de carbono eletrofílico nos xenobióticos, resultando na formação de um conjugado (GS-X) (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; SINGHAL et al., 2015).

A GST pertence a uma ampla família de enzimas multifuncionais, encontrada em todas as classes de eucariotos e bactérias, incluindo pelo menos 26 GSTs expressas em seres humanos (NCBI, 2016a). Além disso, várias classes novas foram identificadas em não mamíferos (ATKINSON; BABBITT, 2009). Em organismos menos derivados, como em ostras, podemos encontrar diferentes isoformas das principais classes das GSTs: *Omega*, *Epsilon*, *Lambda*, *Phi*, *Theta*, *Kappa*, *Mu*, e a classe "U", que representam em torno de 35 GST expressas em *C. gigas* (NCBI, 2016b). Coletivamente, estes dados indicam que as GST são evolutivamente conservadas e que foram se diferenciando para acoplar uma ampla variedade produtos químicos, aos quais os organismos foram entrando em contato ao longo da evolução (ATKINSON; BABBITT, 2009; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

Numerosos estudos com moluscos mostram que a atividade enzimática GST é alterada pela exposição a vários xenobióticos. As GSTs são catalisadores eficazes e participam na detoxificação de compostos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ibuprofeno e toxinas de algas (LÜCHMANN et al., 2011; SERRANO et al., 2015; ZOU et al., 2015). No entanto, existem poucos relatos na literatura sobre o papel das isoformas da GST em bivalves, o que podemos encontrar são pesquisas que mostram alterações bioquímicas e moleculares frente a ensaios ecotoxicológicos (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; PESSATTI et al., 2016).

Para contemplar o processo de biotransformação, a fase III é responsável pela eliminação dos metabólitos e conjugados formados na fase I e II. Uma vez formados, estes conjugados são eliminados da célula por proteínas transmembrana. Estas proteínas conferem resistência a múltiplas drogas quando são expressas em grande quantidade, conhecidas como proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR). São proteínas

transportadoras de membrana que podem catalisar o transporte dependente de ATP de uma enorme variedade de ânions hidrofóbicos (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; SHEEHAN et al., 2001)

Assim como as GSTs, existe uma grande variedade de isoformas da família MDR, porém há poucos estudos em organismos invertebrados, especialmente em bivalves. Ao avaliar a identidade global das sequências de aminoácidos com homólogos correspondentes a partir de outros organismos, percebe-se um sistema diferenciado nesses animais. Em uma pesquisa com *Mytilus californianus*, foi observado uma baixa identidade das proteínas MDR da família ABCB e ABCC, de 38-50% e 27-44%, respectivamente (LUCKENBACH; EPEL, 2008). Estas proteínas de membrana também foram encontradas em diferentes invertebrados aquáticos como *Porifera*, *Echinodermata* e outros do filo *Mollusca*. Isto mostra que há uma amplitude evolutiva das proteínas MDR, mesmo com a baixa identidade com as proteínas já anotadas (LUCKENBACH; EPEL, 2008).

1.5 REGULAÇÃO TRANSCRITORIAL DAS DEFESAS CELULARES

Dentre as principais vias de regulação transcricional de defesas antioxidantes temos a via do Nrf2/ARE e a do AhR/XRE (do inglês *Receptor aril hidrocarboneto/ Elemento de resposta a xenobióticos*). AhR é um fator de transcrição hélice-volta-hélice considerado como um intermediário crítico na resposta a agentes tóxicos e cancerígenos. Este fator atua na ativação transcricional de genes detoxificadores de xenobióticos que possuem uma sequência típica. O elemento de resposta a xenobióticos (XRE) na região promotora de genes que são controlados pelo AhR. AhR encontra-se estabilizada no citoplasma presa a várias chaperonas como proteína de choque térmico 90 (HSP90) e X-proteína 2 associada (XAP2). Após a ligação com algum xenobiotico, ocorre uma alteração conformacional na estrutura do AhR, permitindo a sua translocação nuclear. No núcleo, juntamente com o translocador nuclear de AhR, ele interage com o XRE. Estes XRE, estão presentes nas regiões reguladoras dos genes-alvo específicos, incluindo receptor de AhR e proteínas da família citocromo P450, resultando na ativação de diversas vias metabólicas e de detoxificação (BROKKEN; GIWERCMAN, 2014).

Outro fator de transcrição muito estudado é o Nrf2 (do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), pertencente a um subconjunto de genes do tipo zíperes de leucina. Os membros desta família incluem NFE2, Nrf1 (NFE2L1), Nrf2 (NFE2L2), e Nrf3 (NFE2L3). Este grupo compar-

tilha um domínio estrutural conservado, denominado domínio CNC (do inglês *cap 'n' colar*), essencial para a indução coordenada de proteínas envolvidas no metabolismo de drogas, na resposta ao estresse oxidativo, na citoproteção, na regulação metabólica e no ciclo celular (HEISS et al., 2013; WILLIAMS et al., 2013). Estes fatores de transcrição ocorrem em vertebrados, desde os peixes até os mamíferos. Em invertebrados podemos encontrar estas proteínas como em *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e em ostras como a *C. gigas* com a anotação do Nrf1 e Nrf2 (NCBI, 2016c; STAAB et al., 2013).

Boa parte dos genes alvo de Nrf2 estão envolvidos na proteção celular contra agentes tóxicos eletrofilicos ou oxidantes. Exemplos: quinona oxidorreductase-1 (NQO1), superóxido dismutase, várias isoformas de GST, GPx, heme oxigenase-1, glutamato cisteína ligase (GCL), tioredoxina 1, GR, entre outros. A indução destas proteínas protege as células contra danos oxidativos, entre outros. A ativação coordenada desses genes é atribuída ao compartilhamento de uma região promotora semelhante, conhecida como ARE, à qual o Nrf2 juntamente com proteínas (pequenas Maf cinases) ligam-se ao DNA, ativando, assim, a expressão destes genes (LOBODA et al., 2016).

Em condições basais Nrf2 encontra-se no citoplasma, inativo pela sua ancoragem a Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*) e outras pequenas proteínas como ubiquitina ligase E3 (Cul3). Ao ligar-se no complexo de proteínas ancorados ao Keap1, o Nrf2 é constantemente ubiquitinado e levado a degradação. O Keap1, ao sofrer oxidação/modificação em suas cisteínas críticas, permite que o Nrf2 seja liberado, o que permite a sua translocação nuclear. Estruturalmente, o Nrf2 possui 7 domínios denominados Neh, mas é a região Neh2 que interagem com Keap1 por intermédio dos motivos DLG e ETGE (Fig. 1). Keap1 atua como intermediário na ubiquitinação de Nrf2 ao ligar-se com Cul3, levando-o a degradação proteossomal (Fig. 2). Este processo mantém níveis baixos Nrf2, impedindo sua translocação nuclear e ligação ao DNA, onde teria efeitos de sinalização (MAHER; YAMAMOTO, 2010).

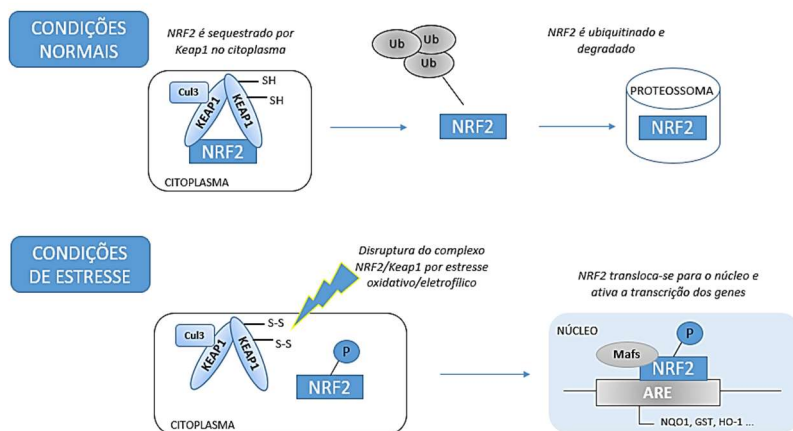
Figura 1. Estrutura dos domínios do fator de transcrição Nrf2.



O domínio Neh2 controla a interação com seu repressor, Keap1, pela ligação aos motivos, DLG e ETGE. O Neh 3, 4 e 5 atuam como coativadores para liberar a transcrição dos genes alvos do Nrf2. O domínio Neh1 (região CNC) é responsável pela interação com a região promotora ARE juntamente com as pequenas Mafs. Neh6 é um sítio de ligação de uma proteína específica, β -Trcp (do inglês *β -transducin repeat-containing protein*), que atua como substrato adaptador para o complexo da ubiquitina ligase e outras proteínas (Adaptado de: CARMONA-APARICIO et al., 2015).

Há duas vias descritas que levam à ativação da via Nrf2/ARE, as quais estão relacionadas à interação direta ou indireta aos grupamentos cisteína das duas proteínas. A variedade e conservação destes resíduos de cisteína, principalmente na estrutura do Keap1, lhe possibilita uma multiplicidade de interações com diferentes moléculas. Devido a múltiplos potenciais de interação, essa via pode ser ativada por diversos compostos. Os agentes estressores oxidativos e eletrofilicos podem interagir diretamente com esses resíduos de cisteína do Keap1 levando a uma modificação estrutural, desestabilizando a interação proteína-proteína de Nrf2/Keap1. Mas esta liberação também pode ocorrer pela mediação desses agentes que levam à fosforilação de Nrf2 por proteínas cinases (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007; KOBAYASHI et al., 2009).

Figura 2. Esquema geral para a indução da expressão de genes através da via de sinalização Nrf2/ARE.



Em condições normais Nrf2 encontra-se ancorado a proteína Keap1, e outras como Cul3 (Ubiquitina ligase E3) no citoplasma, sendo constantemente ubiquitinado (Ub) e levado à degradação proteossomal. Em situações de estresse oxidativo ou eletrofilico, ocorre a ruptura do complexo Nrf2/Keap1 pela oxidação das cisteínas do Keap1 (cisteínas reduzida: SH/ cisteína oxidada = S-S). Subsequentemente Nrf2 é fosforilado (P), translocado para o núcleo e com o auxílio de outras proteínas como as pequenas MafK, se liga a região promotora ARE, encontrada em diferentes genes regulados por Nrf2 (NQO1: quinona oxidorreductase-1; GST: glutathione S-transferase; HO-1: heme oxigenase-1)(Adaptado de: HUANG et al., 2015).

Quando livre, o Nrf2 se acumula no citoplasma e é transportado para o núcleo por importinas. Para sua ligação ao DNA, associa-se a outras proteínas como, por exemplo, ATF4 (do inglês *activation transcription factor 4*), JunD (do inglês *Jun D Proto-Oncogene*), PMF-1 (do inglês *polyamine-modulated factor-1 protein*), entre outros, funcionando principalmente como um ativador da transcrição em parceria com pequenas proteínas cinases, conhecidas com MafK (Fator de transcrição bZIP Maf). O conjunto de fatores de transcrição resultante acopla-se, então, à sequência regulatória potenciadora de ação-cis ARE, que controla a expressão basal e induzível de genes antioxidantes em resposta a xenobióticos, ERO, metais pesados e luz ultravioleta (KASPAR; NITURE; JAISWAL, 2009) (Fig. 2).

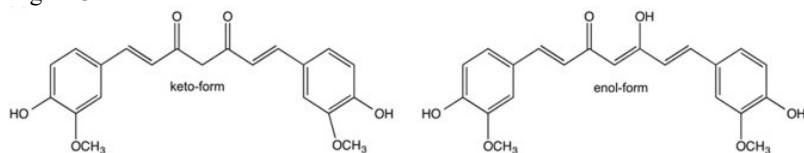
Uma ampla gama de moléculas pequenas, naturais e sintéticas, com origens químicas diversas são indutores potentes da atividade Nrf2. Algumas destas moléculas são de particular interesse, que foram aprovados para uso humano. Entre estes são indutores o α -tocoferol, 1-isotiocianato-4R-(metilsulfinil) butano, tert-butilhidroquinona (tBHQ), 1,2-dithiole-3-tionas, curcumina, *acetylenic tricyclic bis (cyano enone)* e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2010; YAN et al., 2010). Uma propriedade universal dos indutores do Nrf2 é a inibição da ubiquitinação mediada pelo complexo associado ao Keap1, atuando diretamente sobre seu grupo tiol. Isto faz com que Nrf2 não seja direcionado para a degradação pelo proteossoma, sendo assim liberado, aumentando a sua ligação ao ARE, e, por fim, ativando a transcrição de genes citoprotetores (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2010).

O potencial tóxico de uma substância está relacionado com o equilíbrio entre a ativação de intermediários reativos e a atividade das enzimas detoxificadoras. Geralmente, as enzimas de conjugação e relacionadas não são expressas na sua capacidade máxima, mas são altamente induzíveis através da ativação transcricional, com uma ação prolongada e a potencial proteção contra danos oxidativos (KENSLE; WAKABA-YASHI; BISWAL, 2007).

1.6 CURCUMINA

Curcumina é um difenol hidrofóbico, isolado do rizoma da planta *Curcuma longa*, popularmente conhecido como Açafrão-da-terra. Podemos encontrá-la em duas principais estruturas químicas em um estado de ligação estabilizada pelo hidrogênio na forma de ceto ou enólica (Fig. 3). O estado no qual a curcumina é encontrada é dependente da polaridade e pH do solvente. Seus espectros de absorção diferenciam-se, com uma absorção máxima em 422 nm em soluções ácidas, apresentando uma cor vermelho-alaranjado. Curcumina é rapidamente degradada em menos de 30 min, principalmente em soluções alcalinas, uma vez que é mais estável em soluções ácidas (ESATBEYOGLU et al., 2012). A degradação de curcumina é proporcional à sua concentração, com a geração de 4 compostos: ácido ferúlico, vanilina, feruloilmetano e trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-4-dioxo-5-hexeno (WANG et al., 1997).

Figura 3. Curcumina na forma de ceto e enólica.



Fonte: (ESATBEYOGLU et al., 2012)

Em questões de biodisponibilidade, estudadas em mamíferos, a curcumina tem baixa absorção pelo intestino e rápida metabolização pelo fígado. Ao ser absorvida, ela entra na via de biotransformação de fase II, pela conjugação com ácido glucurônico e com o sulfato, sendo reduzida a tetra-hidrocurcumina, hexahidrocurcumina, octohidrocurcumina e hexahidrocurcu-minol. A curcumina pode ser novamente reduzida a curcumina glucuronosídeo, dihidrocurcu-mina-glucuronosídeo, tetrahidrocurcumina-glucuronosídeo e curcumina sulfato (PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014), com excreção nas fezes e urina (PAN; HUANG; LIN, 1999).

Vários estudos nos últimos anos demonstraram a capacidade da curcumina em modular múltiplos alvos moleculares. Já foi demonstrado que a curcumina influencia numerosas cascatas bioquímicas e moleculares, entre estes alvos está fator de transcrição Nrf2 (ANAND et al., 2007; GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008). A curcumina pode modificar os grupos tiol do Keap1 e inibir a interação proteína-proteína de Nrf2/Keap1, favorecendo a translocação nuclear do Nrf2 e aumentando a expressão de várias enzimas das defesas antioxidantes (JIMÉNEZ-OSORIO; GONZÁLEZ-REYES; PEDRAZA-CHAVERRI, 2015). A curcumina é considerada como um indutor clássico desta via de ativação transcricional de defesas antioxidantes. Além de mamíferos, já se observou vários de seus efeitos benéficos em peixes (MANJU; AKBARSHA; OOMMEN, 2012), assim como em *Drosophila* (BOTT et al., 2016), todos relacionados à ativação de Nrf2. Estas respostas foram observadas em um trabalho onde peixes da espécie *Anabas testudineus* foram suplementados com 1% de curcumina. Nesse trabalho foi confirmado um efeito favorável deste derivado da *Curcuma longa* por uma potencial melhora no estado antioxidante. Foi demonstrado aumento da atividade superóxido dismutase e catalase, além de diminuir os níveis de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica) (MANJU; AKBARSHA; OOMMEN, 2012).

1.7 TERT-BUTILHIDROQUINONA (tBHQ)

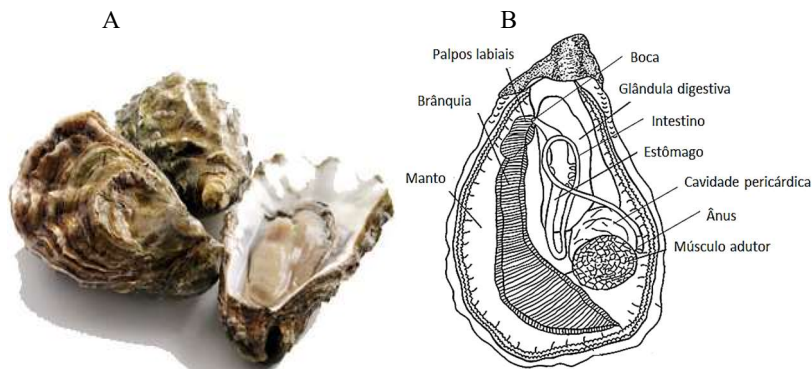
O tert-butilhidroquinona (tBHQ) é um produto antioxidante sintético fenólico, utilizado como conservante alimentar em óleos vegetais e em gorduras animais saturadas. Muitas vezes descrito na literatura como cancerígeno, pois ao ser metabolizado, é conjugado com glutathione formando várias hidroquinonas, metabólitos que são nefrotóxicos (PETERS et al., 1996). Outros relatos em pesquisas trazem diferentes perspectivas mostrando sua ação antioxidante contra ERO (SUN; REN; SIMPKINS, 2015).

O tBHQ é um exemplo de indutor clássico de Nrf2, utilizado nas pesquisas em mamíferos e peixes, confirmando a indução de enzimas antioxidantes, como GR, GST e GPx (HE et al., 2013). Vários estudos têm feito um pré-tratamento com indutores de Nrf2, assim, aumentando significativamente a expressão do mRNA de genes controlados por esta via. He e colaboradores (2013) observaram uma ativação na expressão dos genes de *GSTpi*, GPx e a proteína desacopla-tora 2 (UCP2) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratadas com tBHQ e cianotoxinas. Estes dados sugerem a ação do Nrf2 e sua proteção nestes animais, sendo realizadas pela indução de enzimas de fase II de biotransformação. Foi demonstrado, em 2002, que a exposição de embriões de *Danio rerio* a tBHQ ou tert-butilhidroperóxido (tBOOH) induz uma resposta protetora contra estresse oxidativo. Os autores mostraram, através da clonagem de Nrf2 e Keap1 desses peixes, sua capacidade de indução de genes como GST, NQO1 e GCLC (HAHN et al., 2015a).

1.8 OSTRAS COMO MODELO

A espécie *C. gigas* (Thunberg, 1793) (Fig. 4) conhecida também como ostra do Pacífico ou ostra Japonesa, é um molusco bivalve pertencente ao filo *Mollusca*, classe *Bivalvia*, família *Ostreidae* e gênero *Crassostrea* (*Mollusca*, *Bivalvia*). *C. gigas* apresenta uma concha inferior curva (em contato com o substrato), extremamente enrugada e laminada. No seu habitat preferido ficam presas a um substrato, por exemplo, rochas, conchas ou detritos. É um animal filtrador, com o consumo de fitoplâncton e alguns protozoários (ROBINSON et al., 2005). Originalmente distribuída no Leste da Ásia, foi introduzida com sucesso em muitos países e se tornou uma espécie importante na aquicultura sendo a mais cultivada e consumida no mundo (ZHANG et al., 2016).

Figura 4. Modelo interno e externo de *Crassostrea gigas*



A) Ostra *Crassostrea gigas*, exemplar adulto; B) representação anatômica da estrutura interna da ostra. Adaptado de: AMARAL; SIMONE, 2014.

No Brasil o cultivo de moluscos marinhos teve início em 1971 e a introdução de *C. gigas* em 1974. Em Santa Catarina, as pesquisas e o cultivo de ostras ganhou impulso na década de 1980. Com excelentes condições biológicas, ambientais e com disponibilidade de mão de obra, o litoral catarinense se tornou o principal produtor de ostras no Brasil (PAULILO, 2002).

A ostreicultura é especialmente importante no estado, pois teve início com a ideia de ampliação da renda familiar de pescadores artesanais; hoje tornou-se importante fonte de renda das comunidades e da economia local. Com 572 maricultores, dentre estes 107 ostreicultores, envolve 2.315 empregos diretos com produtores distribuídos em 12 municípios do litoral catarinense. Entre os principais municípios estão Florianópolis, Penha, Governador Celso Ramos, Bombinhas, Palhoça e Porto Belo. Santa Catarina responde por 98,1% da produção nacional, com aproximadamente 3 mil toneladas de ostras comercializadas em 2015. Esse volume de produção gerou uma movimentação financeira bruta estimada em R\$21 milhões no estado (CIDASC, 2016; EPAGRI - ESTADÍSTICAS DA AQUICULTURA, 2015).

Como animais marinhos sésseis que vivem em regiões estuarinas e zonas litorâneas, as ostras devem lidar com mudanças ambientais dinâmicas. Podem tolerar temperaturas de -2 a $+35$ °C e supostamente sobreviver à salinidades menores de 10 e maiores a 35‰. Com um sistema de alimentação por filtração, as ostras enfrentam grande exposição a patógenos microbianos e experimentam uma ampla gama de influências antropogênicas direta e indiretamente, incluindo as alterações climáticas e a

poluição (FAO, [ca.2004]; ZHANG et al., 2012). Esta espécie se tornou um dos melhores modelos para estudos bioquímicos, moleculares e genéticos, entre os animais bivalves. Por ser de fácil manejo e desenvolvimento torna-se um organismo atraente para compreender as respostas da população às pressões e adaptação ambientais, bem como para decifrar as bases fisiológicas de características complexas (crescimento, reprodução, sobrevivência) (DHEILLY et al., 2011).

Estudos visando avaliar os níveis de contaminantes em ecossistemas aquáticos e seus efeitos sobre a biota utilizam moluscos bivalves (ostras e mexilhões) como organismos sentinelas (LÜCHMANN et al., 2014; TREVISAN et al., 2014a). A disponibilidade do genoma de *C. gigas*, oferece a oportunidade de estudar a resposta desse organismo também em nível molecular. Porém, por se tratar de um invertebrado, muitos mecanismos celulares e moleculares, além de técnicas, são obstáculos para uma investigação mais profunda. Contudo, ostras são economicamente e ecologicamente importantes. Seu estudo irá contribuir para o conhecimento nas áreas de genômica funcional e comparativos evolutivos, lançando nova luz sobre a função do genoma e diversidade única em ostras (BAINY et al., 2000; DHEILLY et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Historicamente no ocidente, o uso de bivalve na ciência se estende há mais de 50 anos, primeiramente foram utilizados em análises químicas para detecção da presença dos níveis de contaminantes orgânicos no ambiente aquático (STEGEMAN; TEAL, 1973). Hoje, várias técnicas bioquímicas e moleculares já estão bem caracterizadas para estes animais, abrangendo desde ensaios enzimáticos de superóxido dismutase, catalase, GST, GPx, GR, tioredoxina redutase (TrxR), a expressão destes genes, entre outros. Estas enzimas são ferramentas para a avaliação de risco ambiental de contaminação em ostras, por apresentarem alterações em suas atividades, frente a algum desafio de estresse. Podemos observar este efeito em um trabalho em que ostras do Pacífico (*C. gigas*) foram expostas ao composto CDBN. Esse tratamento levou ao aumento da atividade de GST e inibição das enzimas GR e TrxR (TREVISAN et al., 2012). Trabalhos com regulações transcricionais são escassos em bivalves e precisam de maior atenção. Através da disponibilidade do genoma de *C. gigas*, foram anotados genes dos fatores de transcrição Nrf1, Nrf2 e Ahr, porém suas funções ainda não foram estudadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta das defesas antioxidantes em ostras do Pacífico, *Crassostrea gigas*, tratadas com indutores da via Nrf2/ARE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Induzir defesas antioxidantes em ostras *C. gigas* pelo tratamento com curcumina ou tBHQ.
- ✓ Verificar se os tratamentos com curcumina ou tBHQ alteram nos níveis de mRNA do Nrf2 e Keap1;
- ✓ Avaliar a biodisponibilidade da curcumina ou tBHQ na água do mar e em tecidos das ostras;
- ✓ Verificar se o pré-tratamento com curcumina ou tBHQ afeta a resistência às ostras expostas ao agente oxidante hidróperóxido de cumeno;
- ✓ Investigar se a diminuição na atividade das enzimas estudadas (GR, GST, GPx) é afetada pela tBHQ em ensaios *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS

As sequências homólogas dos genes Nrf2 (XM_011419592.1) e Keap1 (XM_011433564.1) de *C. gigas* foram confirmadas com a ferramenta *blast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de nucleotídeos e proteínas. Uma análise dos domínios conservados para Nrf2 e Keap1 foi realizada através da ferramenta de pesquisa de domínios conservados na página do NCBI (Centro Nacional de Informação Biotecnológica: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, acessado em 12/2016). Foram selecionadas sequências representativas de nucleotídeos e de aminoácidos de Nrf2 e Keap1 de algumas espécies de moluscos e vertebrados. Estas foram submetidas às análises de alinhamento múltiplo e de filogenia em comparação com *C. gigas*. Os alinhamentos de múltiplas regiões conservadas foram realizados por ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>, acessado em 08/2016), e a análise de filogenia foi realizada por Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr>, acessado em 09/2016). A identidade e o *E-value* das sequências selecionados de mRNA, brm como da proteína foram calculados por *Balstn* e *Blastp*, respectivamente, com o alinhamento de sequências duplo (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acessado em 08/2016). Para completar as análises foi usado uma plataforma *on-line*, MUSCLE (v. 3.8.31) para alinhamento múltiplo, Gblocks (v. 0.91b) para o alinhamento automático, PhyML (v. 3.1 / 3.0 aLRT) para a construção de árvores filogenéticas e TreeDyn (v. 1.98.3) para o desenho de árvores filogenéticas. Todos estes programas foram usados com as configurações padrão da plataforma (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006; CASTRESANA, 2000; CHEVENET et al., 2006; DEREPPER et al., 2008; EDGAR, 2004; GUINDON; GASCUEL, 2003).

3.2. ANIMAIS E CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

As ostras do Pacífico, *C. gigas*, adultas (comprimento: 9-14 cm, peso das partes moles: 22,3 ± 6,4g) foram obtidas de uma fazenda marinha localizada em Florianópolis, SC (Fazenda Marinha Atlântico Sul/Latitude: -27.681203/ longitude: -48.4937213). Os animais foram mantidos durante duas semanas em condições de laboratório antes de serem submetidos ao experimento, em tanques de plástico nas seguintes condições:

1 animal/L de água do mar tratada com UV e filtrada, temperatura variando entre 18 e 21 °C, salinidade a 35‰ e aeração constante. As ostras foram alimentadas a cada dois dias com uma dieta comercial de plâncton (Sera® Marin Coraliquid, Alemanha). Após o período de aclimação, elas foram colocadas em aquários de vidro e expostas à curcumina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) nas concentrações nominais de zero (controle), 10 e 30 µM, e expostas durante 24, 48 ou 96h. Uma alíquota concentrada de curcumina foi previamente preparada em 1 ml de NaOH 0,5M, o qual não afetou o pH da água do mar. Para a obtenção da concentração final, as soluções com 70 mM e 200 mM foram diluídas em água do mar até atingir as concentrações desejadas, 10 e 30 mM, respectivamente. Os animais foram mantidos em 1 L de água do mar/animal, com 7 indivíduos por aquário.

As ostras também foram expostas a tBHQ (tert-butilhidroquinona) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 10 e 30 µM em aquários de vidro, por um período de 24, 48 e 96 horas.

As concentrações selecionadas de curcumina e tBHQ (10 e 30 µM) foram baseadas em experiências anteriores realizadas com células de mamífero (SATO; MCKERCHER; LIPTON, 2013; TEBAY et al., 2015). Durante o período de exposição, as ostras não foram alimentadas, a água não foi trocada e as concentrações de curcumina e tBHQ não foram renovadas. Nos tempos indicados, as brânquias e a glândula digestiva foram coletadas, pesadas e armazenadas a -80 °C, até serem utilizadas para análises moleculares (n= 5) ou bioquímicas. Utilizaram-se pelo menos 15 animais de 2 a 3 experimentos para análises bioquímicas, com exceção das 24 h que resultaram de um único experimento (n = 6-7).

3.3. NÍVEIS DE EQUIVALENTES DE CURCUMINA NA ÁGUA DO MAR E NOS TECIDOS

Os níveis de curcumina e curcuminoides em água (n = 6/30 µM), na presença ou ausência de animais, foram determinados por espectrofotometria a cada 1h por 12h em 422 nm (KADAM et al., 2013), um pico típico no espectro de absorbância da curcumina (Fig. 9A). Utilizou-se uma solução fresca de curcumina para criar uma curva padrão feita em água do mar.

Os níveis de equivalentes de curcumina (curcumina e seus derivados) também foram avaliados por espectrofotometria em tecidos de ostras *C. gigas* durante a exposição. Após um passo de extração em fase líquida, baseado em um protocolo previamente descrito (VAREED et al.,

2008), com pequenas modificações, as amostras (brânquias e glândula digestiva, 200 mg cada, $n=6$) foram coletadas. Estas, foram homogeneizadas em solução salina tamponada com fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM, pH 7.4). Os homogeneizados foram adicionados a uma solução de acetato de etila e metanol (95:5; v:v), na proporção 1:1. As amostras foram intensivamente homogeneizadas, centrifugadas (1000 g por 10 min) e o sobrenadante foi coletado e analisado por espectrometria na faixa de 250-600 nm (Fig. 9C e D). A absorbância em 422 nm foi utilizada para calcular os níveis de curcumina nos tecidos. Utilizaram-se amostras de tecidos obtidos de animais não tratados, para se obter as curvas de absorbância de linha de base, cujos valores em 422 nm foram utilizados para a subtração do plano de fundo (Fig. 9C e D). Foi utilizada uma curva padrão de curcumina, preparada da mesma forma, para calcular a concentração de curcumina. A natureza química das substâncias acumuladas nos tecidos de ostra, e que apresentaram absorbância em 422 nm não foram identificadas. Presume-se que sejam curcumina e metabólitos relacionados (curcuminoides) (ANAND et al., 2007) e, portanto, os dados são expressos como equivalentes de curcumina.

3.4. NÍVEIS DE tBHQ NA ÁGUA DO MAR

Um experimento adicional foi executado para avaliar os níveis de tBHQ (30 μM) na água do mar, na presença e ausência de ostras ($n=6$). Os compostos foram avaliados por espectrofotometria, pela absorbância de dois picos conhecidos, relacionados com tBHQ, que correspondem aos comprimentos de onda 252 e 290 nm. Foram feitas amostragens ao longo de 12 h. As alterações de absorbância em 252 nm representam o desaparecimento de tBHQ, e as alterações em 290 nm representam a sua transformação em 2-terc-butil-1,4-benzoquinona (tBBH), como descrito anteriormente (OOI et al., 2013).

3.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para as análises das atividades de GR, GST e GPx, as amostras (brânquia e glândula digestiva) desafiadas com curcumina e tBHQ foram homogeneizadas (1:3 w:v) em 20 mM de tampão contendo ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico (Hepes), pH 7,0 e centrifugadas a 20 000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -80°C, até à utilização.

A atividade da GR foi determinada monitorando-se o decréscimo da absorbância à 340 nm, devido ao consumo de NADPH durante a redução da GSSG (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade de GST foi determinada por espectrofotometria (HABIG; JAKOBY, 1981), utilizando-se CDNB e GSH como substrato. A formação do conjugado GSH-CDNB foi monitorada em 340 nm. A redução do hidroperóxido de cumeno (CHP) por GPx conduz à formação de GSSG, que é reduzida novamente a GSH pela GR adicionada à reação. Neste ensaio, a atividade de GPx é proporcional ao consumo de NADPH (WENDEL, 1981).

Para o ensaio de glutatona total (GSH-t, indicando a soma das formas GSH e GSSG), as amostras frescas foram homogeneizadas em ácido perclórico, 0,5 M (1:10; v:v), e centrifugadas à 15.000 g, durante 2 min, à 4 °C. Antes do ensaio, o sobrenadante foi neutralizado em tampão fosfato de potássio 0,1 M, e analisado por espectrofotometria a 340 nm (AKERBOOM; SIES, 1981). Os níveis de GSH-t foram obtidos com base numa curva padrão com GSH.

3.6. TESTE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA *in vitro*

Extratos das brânquias de ostras (n=6, pool de 2 animais, 200mg) foram preparados conforme descrito na Seção 3.5. A este extrato foi adicionado tBHQ 30 µM diluída em água do mar ou somente realizado a adição de água do mar como controle. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 4 h, e em seguida analisadas quanto as atividades enzimáticas GST, GR e GPx (Seção 3.5).

Também foi avaliado se a incubação com tBHQ leva à inibição da enzima GR disponível no comércio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Para isto foi adicionado NADPH 0,2 mM, por 5 min, à solução contendo a enzima (4 mU), para que a enzima esteja na forma reduzida quando incubada com tBHQ. Em seguida, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 4 h na presença de tBHQ 30 µM ou água do mar como controle. Após estas 4 h, a atividade GR foi analisada como descrito nas Seção 3.5.

3.7. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIP-TASE REVERSA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A extração do RNA total das brânquias foi realizada com reagente TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações. O DNA genômico residual foi degradado por tratamento com DNase I (Fermentas, São Paulo,

Brasil) e a qualidade do RNA foi determinada por espectrofotometria pela razão de absorbância 260/280 nm. A transcrição reversa foi realizada com 1 µg de RNA total e com o uso do kit “Transcriptase Reversa RevertAid®” (Fermentas, São Paulo, Brasil), de acordo com o protocolo do fabricante.

Os iniciadores de DNA foram concebidos utilizando-se o software NCBI/Primer Blast e PrimerQuest® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> e <http://www.idtdna.com>, acessado em 05/2015) com base na sequência completa e/ou parcial de RNAm de cada gene obtido do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acessado em 05/2015).

Os iniciadores (Tab. 1) foram desenhados para: Nrf2, Keap1, GR, glutational S- transferase *pi-like* (GST*pi*), glutamato-cisteína ligase subunidade catalítica (GCL), proteína multi-resistência *3-like* (MDR3), e glutational peroxidase *2-like* (GPx2). O fator de elongação 1- α (EIF-1 α) e o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados como referência para todas as análises, exceto para normalizar Nrf2 e Keap1, utilizado beta-tubulina (β -tubulina). Em um teste preliminar, verificamos 3 iniciadores para o gene Nrf2: 1) Fw "GGAGAACTTCATGCGG-GATG"/Rv "CTGAAACTGGCTGGTCTGGT"; 2) Fw "GAATCAC-TCCAACGCCCTGA"/Rv "CACTCTAGTGGGGAGGAGC", e 3) Fw "GAACTTGATGCCGTTTCAGCC"/Rv "GTCTCCACAAGGAAAG-TGAATC", que produziram respostas equivalentes, por isso, usamos o terceiro par de iniciadores com um resultado um pouco melhor, como ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1. Genes de interesse de ostras *Crassostrea gigas* e suas respectivas sequências de iniciadores para análises de RT-qPCR com base no banco de dados *GenBank*.

| Gene | Sequência 5'-3' | Número de acesso |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------|
| Nrf2 | Fw - GAACTTGATGCCGTTTCAGCC Rv - GTCTCCACAAGGAAAGTGAATC | XM_011419592.1 |
| Keap1 | Fw - GAGTCCAAGAAGTGCTCTAAG Rv - GTCAGGATCATAGCACTCAAC | XM_011433564.1 |
| GR | Fw - GAATCTCGTTACGGCTGTTC Rv - TTGATCCCAAACCTCTGCTGC | XM_011452369.1 |
| GST <i>pi</i> | Fw - AGGCGATTTTCACCTCTGTC Rv - TTCCTTCTGCCACAAAGTCG | AJ557140.1 |
| GCL | Fw - TCACAGAGCCTCAGGTAAGT Rv - GTCGTAGTTAATGCGGTCAG | XM_011442085.1 |
| MDR3 | Fw - CGGACGAATTGATGTAACGC Rv - CCCAACCAAAAGTCTCATAGC | XM_011445305.1 |
| GPx2 | Fw - GCCAGTAAAATCCTGTGGGC Rv - TGCCGTCAGGTGTGATGAG | XM_011454226.1 |
| EF1- α ¹ | Fw - GTTTGAGGGAAACTGGGAATGC Rv - TCCGTCGGAATATGTCAGTTTAGC | AB122066.1 |
| GAPDH ¹ | Fw - GCTGTGACACCATTGGAGAA Rv - ACCAATGACGCAACAAGCGA | AJ544886.1 |
| β -Tubulin ¹ | Fw-CCAGCAGATGTTTCGACCCAAGAA Rv - AACATGGCAGCAACGGTGAGGTAG | AB196534 |

¹Genes normalizadores

A reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada com o equipamento termociclador Real Time PCR HT 7900 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), utilizando Hot FirePol Eva Green qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estônia), nas seguintes condições de ensaio: 1 ciclo a 95 °C por 10 min; 40 ciclos de amplificação a 95 °C durante 15 s; 60 °C durante 30 s; 72 °C durante 30 s, e extensão de 95 °C durante 15 s. O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi aplicado a todos os genes e normalizado de acordo com Pfaffl (PFAFFL, 2001). Os resultados são apresentados como níveis de transcrição relativizados ao grupo controle.

3.8. ENSAIO DE RESISTÊNCIA AO ESTRESSE

Para avaliar se o tratamento com curcumina ou tBHQ afetou a resistência ao estresse oxidativo, as ostras foram expostas a 30 μ M e 10 μ M dos compostos, respectivamente, por 96 h, conforme descrito na seção 2.1. Após 96 h, a água foi substituída por água do mar contendo 3 mM de hidroperóxido de cumeno (CHP). Este mesmo procedimento, troca de água e adição de CHP foi feita a cada 24 h. Os animais foram mantidos durante 96 h adicionais sob aeração constante, temperatura controlada (18-21 °C) e sem alimentação. Os animais controle permaneceram somente com água do mar em dois ciclos de 96h com troca de água entre os ciclos. Foram utilizados dois tanques com 6 animais/tanque, 1 animal/L de água do mar para cada tratamento e a mortalidade acumulada foi determinada pela contagem dos animais mortos, o que foi feito a cada 24 h.

3.9. WESTERN BLOT

A técnica de *Western blot* foi utilizada para detecção da GR de amostras de brânquias de ostras *C. gigas* tratadas com tBHQ 30 μ M, após 96 h de exposição. O tecido foi homogeneizado em tampão de lise gelado contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, coquetel inibidor de protease a 1%, PMSF 100 mM, ortovanadato de sódio 2 mM, Triton X-100 a 1% e Glicerol a 10%. As amostras foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE (10%), e as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5%, diluído em TBST (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5), lavadas 3 vezes e incubadas com anticorpo primário (1:300) contra GR (Abcam, EUA) e relativizadas com β -actina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). As membranas foram expostas a um anticorpo secundário conjugado com peroxidase adequado e visualizadas utilizando-se um kit de detecção ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). A análise de densitometria foi realizada usando-se o programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>).

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes aos ensaios bioquímicos foram analisados por ANOVA de uma via e as diferenças nos valores médios foram detectadas pelo teste *post hoc* de *Duncan*, quando necessário. Os dados relativos aos ensaios de RT-qPCR foram analisados pelo teste U de *Mann*

Whitney. Para as análises de *Western blot* os dados foram comparados pelo método do *test-t* não pareado. Os ensaios de sobrevivência foram comparados utilizando o teste *Log-rank (Mantel-Cox)*. Todos os dados foram verificados, quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias, pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e *Bartlett*, respectivamente. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média), exceto para os ensaios de sobrevivência, que são mostrados apenas como a taxa de mortalidade média.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISES DE IDENTIDADE E FILOGENIA DE NRF2 E KEAP1 DE *Crassostrea gigas*

Crassostrea gigas tem um único gene identificado como Nrf2 e outro como Keap1, e uma variante do Nrf2 (Nrf1), da família de transcrição fatores zíper de leucina. A análise por CD-NCBI (pesquisa de domínios conservados) de Nrf2 (Fig. 5) mostra que este contém apenas a região CNC conservada, que é a região que faz interação com o DNA. Keap1 apresentou três domínios conservados, além de 8 cisteínas conservadas em todas as espécies analisadas e 5 cisteínas dentre os animais do filo *Mollusca* (Fig. 6). Os domínios conservados foram o BTB, que possui um importante papel na interação de eletrófilos e na mediação com o sistema da Cul3 (CLEASBY et al., 2014); o domínio IVR, possui resíduos de cisteína altamente reativos com eletrófilos atuando como sensores para estímulos eletrofilicos que regulam a associação de Keap1 e Nrf2 (KANG et al., 2004); e o domínio DGR, medeia a interação com Nrf2 em sua região Neh2 (MA; HE, 2012).

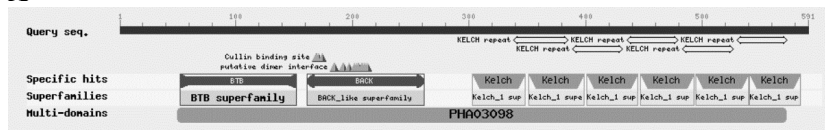
Figura 5. (A) Análise do domínio conservado na sequência da proteína de Nrf2 de *Crassostrea gigas*. (B) Alinhamento múltiplo da região *cap 'n' colar* (CNC, caixa cinza) da sequência de proteína de Nrf2 de *C. gigas* e as proteínas Nrf1/Nrf2 de espécies selecionadas.



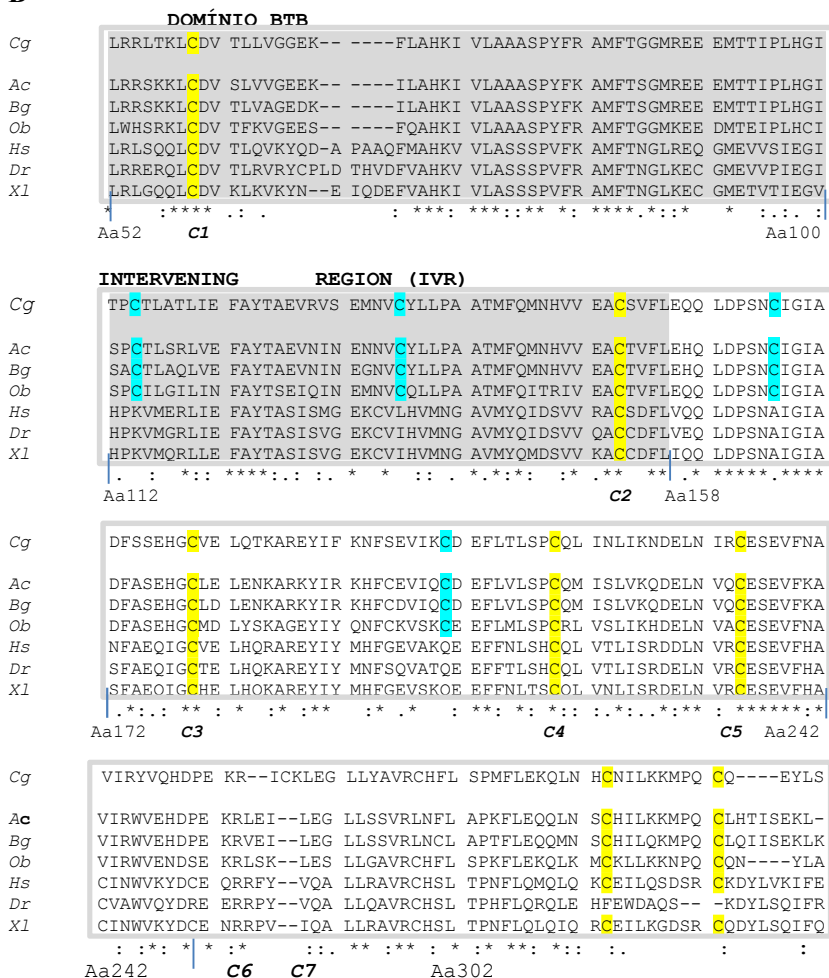
As posições dos aminoácidos referem-se à sequência de *C. gigas*. CgN2: *Crassostrea gigas*/Nrf2; CgN1: *Crassostrea gigas*/Nrf1; Ac: *Aplysia californica*/Nrf1; Bg: *Biomphalaria glabrata*/Nrf2; Ob: *Octopus bimaculoides*/Nrf2; Hs: *Homo sapiens*/Nrf2; Dr: *Danio rerio*/Nrf2; Xl: *Xenopus laevis*/Nrf2.

Figura 6. Análises dos domínios conservados na sequência da proteína Keap1 de *Crassostrea gigas* (A) e na sequência da proteína Keap1 de espécies selecionadas (B).

A



B



| | | DOMÍNIO DGR | | | | | | | | | |
|----|--|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|-----|-----|---------------|
| Cg | | KIFQGLKLHQ | TCPEKPRKC | SPLVIFTAGG | YLRQSLSNFE | YYNPSLNQWT | RLPELPNPRS | | | | |
| Ac | | K---GLKLHQ | KCSDLPRRC | APLVVFCAGG | YLRQSLSNFE | CYNPNVKQWL | RLPDLTPRS | | | | |
| Bg | | N---LKLHM | KCSDLPRRC | SPLVIFCAGG | YLRQSLSNFE | CYNPKNKQWL | RLPDLTPRS | | | | |
| Ob | | RIFEELKLHK | QIPEVCRKC | KPMVIFTAGG | YLRQSLSNFE | FFNLENNEWR | RLPDLVPRS | | | | |
| Hs | | ELT---LHKP | TQVMPCRAPK | VGRLIYTAGG | YFRQSLSYLE | AYNPSDGTWL | RLADLQVPRS | | | | |
| Dr | | DLT---LHKP | TKVIPLRTPK | VPQLIYTVGG | YFRQSLSFLE | AFNPCSGAWL | RLADLQVPRS | | | | |
| Xl | | DLT---LHKP | TLPLQDRIPN | IPQFIYVAGG | YFRQSLSFLE | AYNPVDGEWL | SLASLEMPRS | | | | |
| | | : | * * | ..** | *:***** | : * | * | * | * | * | * |
| | | Aa302 | | Aa323 | | | | | | | Aa362 |
| | | | | | | | | | | | |
| Cg | | GLCCIVKGS | FYCV-GGRNN | SPDGNMDSNA | LDVFDPIRNL | WLSRSPMTVP | RNR | | | | |
| Ac | | GLGACIVRGA | IY-VIGGRNN | SPDGNMDSNS | LDMYDPMRNV | WIPKQPMTVA | RNR | | | | |
| Bg | | GLGACIVRGA | LF-VVGGRNN | SPDGNMDSNN | LDMYDPMRNV | WIPKHTMNF | RNR | | | | |
| Ob | | GLSACVVVGI | LY-VVGGRNN | SPDGNMDSAS | LDMYDPYRNM | WRPCAQMSVP | RNR | | | | |
| Hs | | GLAGCVVGGI | LY-AVGGRNN | SPDGNTDSSA | LDCYNPMTNQ | WSPCAQMSVP | RNR | | | | |
| Dr | | GLAAVISIGL | LY-AVGGRNN | GPDGNMDSHT | LDCYNPMNNC | WRPCAQMSVP | RNR | | | | |
| Xl | | GLAGCVVGGI | FY-AVGGRNN | APDCNKDSDA | LDCYNPMNNO | WSPCAALSV | RNR | | | | |
| | | ** | *: * | : : | . ***** | . ** * | ** * | ** | : * | * * | . : . . . *** |
| | | Aa362 | C8 | | | | | | | | Aa415 |

Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de Keap1 utilizando *C. gigas* como referência, incluindo 4 domínios: BTB - *N-terminal Broad complex, Tram-track and Bric-à-Brac* (52-152); IVR - *intervening region* (152-303), e DGR - *double glycine repeat* (>303). As cisteínas conservadas em todas as espécies analisadas são marcadas a amarelo e numeradas C1-C8. A sequência conservada nas quatro espécies de moluscos, incluídas na análise, é marcada com azul. Cg: *Crasostrea gigas*; Ac: *Aplysia californica*; Bg: *Biomphalaria glabrata*; Ob: *Octopus bimaculoides*; Hs: *Homo sapiens*; Dr: *Danio rerio*; Xl: *Xenopus laevis*.

Uma análise detalhada da similaridade das sequências do Nrf2 e do Keap1 de *C. gigas* com outros animais está disponível nas Tabelas 2 e 3. O alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos foram baseados nas regiões conservadas descritas nas figuras 5 e 6, e os valores de *E-value* e identidade foram analisados através da porcentagem de cobertura de alinhamento (*Query Cover*). As sequências de Nrf2 e Nrf1 revelaram uma cobertura de 8-34% entre moluscos e apenas 2-4% para espécies de vertebrados, com um mínimo de 64% e um máximo de 100% de identidade (Tabela 2A). Quando as respectivas sequências de aminoácidos foram analisadas (Tabela 2B), obtivemos melhores valores de cobertura (30-99%), mas a média da identidade foi relativamente baixa (33-48%), com exceção do Nrf1 da própria *C. Gigas*. Os valores de cobertura de alinhamento de Keap1, assim como a identidade, foram parcialmente mais altos que Nrf2 quando comparamos as diferentes espécies selecionadas (Tabelas 4 e 5). Apesar de baixa cobertura das sequências de nucleotídeos de

Keap1 entre *C. gigas* e os vertebrados, ao compararmos ao nível de aminoácidos, a cobertura foi acima dos 95% para todas as espécies analisadas, com uma identidade de 54-73%.

Tabela 2. Análise de identidade e similaridade da sequência gênica e proteica do Nrf2 de *Crassostrea gigas*.

| (A) Gene | Espécie | Número de acesso ao mRNA | Identidade da região conservada (%) | Query Cover ³ (%) | E-value | Identi- dade (%) |
|-------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|---------|------------------------|
| Nrf1 | <i>Crassostrea gigas</i> | XM_011419590.1 | 100 | 34 | 0.0 | 100 |
| Nrf1 | <i>Aplysia cali- formica</i> | XM_013090757.1 | 58 | 25 | 3e-42 | 67 |
| Nrf2 | <i>Biomphala- ria glabrata</i> | XM_013211185.1 | 56 | 15 | 2e-11 | 64 |
| Nrf2 | <i>Octopus bi- maculoides</i> | XM_014929291.1 | 56 | 8 | 1e-11 | 70 |
| Nrf2 | <i>Homo sapi- ens</i> | NM_006164.4 | 52 | 4 | 2e-10 | 83 |
| Nrf2 | <i>Danio rerio</i> | NM_182889.1 | 56 | 5 | 2e-20 | 75 |
| Nrf2 | <i>Xenopus lae- vis</i> | NM_001086053.1 | 53 | 2 | 0.079 | 98 |

| (B) Pro- teína | Espécie | Número de acesso a proteína | Identidade da região conservada (%) | Query cover ⁴ (%) | E-value | Identi- dade (%) |
|-------------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|---------|------------------------|
| Nrf1 | <i>Crassostrea gigas</i> | XP_011417892.1 | 100 | 45 | 0.0 | 100 |
| Nrf1 | <i>Aplysia cali- formica</i> | XP_012946211.1 | 72 | 80 | 8e-118 | 35 |
| Nrf2 | <i>Biomphala- ria glabrata</i> | XP_013066639.1 | 67 | 99 | 1e-99 | 33 |
| Nrf2 | <i>Octopus bi- maculoides</i> | XP_014784777.1 | 64 | 90 | 5e-114 | 38 |
| Nrf2 | <i>Homo sapi- ens</i> | NP_006155.2 | 59 | 30 | 1e-45 | 48 |
| Nrf2 | <i>Danio rerio</i> | NP_878309.1 | 57 | 42 | 6e-48 | 38 |
| Nrf2 | <i>Xenopus lae- vis</i> | NP_001079522.1 | 57 | 78 | 1e-59 | 30 |

(A) Sequências de nucleotídeos semelhantes ao mRNA Nrf2 de *C. gigas* de acordo com a análise de *blastn*. (B) Sequências de aminoácidos semelhantes à proteína Nrf2 de *C. gigas* de acordo com a análise *blastp*. ¹ mRNA do Nrf2, número de acesso: XM_011419592.1 (*Crassostrea gigas*); ² proteína do Nrf2, número de acesso: XP_011417894.1 (*Crassostrea gigas*); ³ considerado 2849pb; ⁴ considerado 822aa;

Tabela 3. Análise de identidade e similaridade das regiões homólogas de Keap1 de *Crassostrea gigas*.

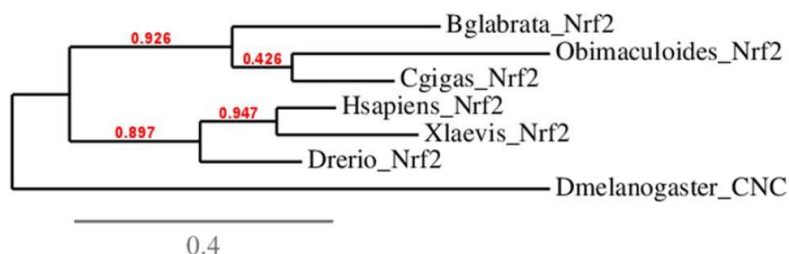
| (A)Espécie | Número de acesso ao mRNA | Identidade da região conservada (%) | Query Cover ³ (%) | E-value | Identidade (%) |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------|----------------|
| <i>Aplysia californica</i> | XM_005111472.2 | 55 | 57 | 1e-115 | 66 |
| <i>Biomphalaria glabrata</i> | XM_013218319.1 | 65 | 59 | 0.0 | 70 |
| <i>Octopus bimaculoides</i> | XM_014926592.1 | 48 | 57 | 8e-180 | 69 |
| <i>Homo sapiens</i> | NM_012289.3 | 44 | 9 | 8e-08 | 80 |
| <i>Danio rerio</i> | NM_001113477.1 | 51 | 5 | 2e-04 | 92 |
| <i>Xenopus laevis</i> | NM_001095480.1 | 46 | 7 | 5e-11 | 82 |

| (B)Espécie | Número de acesso ao mRNA | Identidade da região conservada (%) | Query Cover ³ (%) | E-value | Identidade (%) |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------|----------------|
| <i>Aplysia californica</i> | XP_005111529.1 | 73 | 98 | 0.0 | 73 |
| <i>Biomphalaria glabrata</i> | XP_013073773.1 | 71 | 97 | 0.0 | 72 |
| <i>Octopus bimaculoides</i> | XP_014782077.1 | 69 | 97 | 0.0 | 72 |
| <i>Homo sapiens</i> | NP_036421.2 | 53 | 95 | 0.0 | 55 |
| <i>Danio rerio</i> | NP_001106948.1 | 52 | 96 | 0.0 | 53 |
| <i>Xenopus laevis</i> | NP_001088949.1 | 52 | 96 | 0.0 | 54 |

(A) Identidade do mRNA de Keap1¹ de *C. gigas* versus os mRNAs de Keap1 registrados. (B) Identidade e similaridade entre a proteína² Keap1 de *C. gigas* e as proteínas Keap1 registradas. ¹ mRNA Keap1, número de acesso: XM_011433557.1 (*Crassostrea gigas*); ² proteína Keap1, número de acesso: XP_011431859.1 (*Crassostrea gigas*); ³ considerado 2937pb; ⁴ considerado 591aa

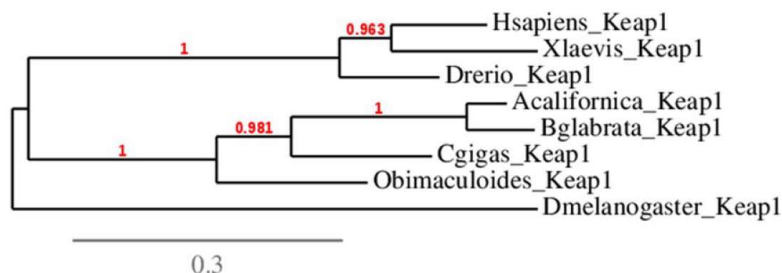
A árvore filogenética das sequências proteicas do Nrf2 (Fig. 7) e Keap1 (Fig. 8) de *C. gigas* foi montada com base na sequência de outros moluscos, vertebrados e de um artrópode, previamente selecionados. Uma proteína homóloga de Nrf2 de *Drosophila melanogaster*, a isoforma A de CNC, foi adicionada a esta análise. Como resultado foram formados três clados ou subgrupos principais, correspondente aos animais selecionados (artrópodes, moluscos e vertebrados). A análise pelo método filogenético de máxima verossimilhança mostrou que os comprimentos dos ramos para Nrf2 (Fig. 7) foram mais curtos nos vertebrados, quando comparados com os moluscos. Ou seja, os testes indicam taxas de substituição de aminoácidos relativamente diferentes, com vertebrados apresentando os valores mais baixos. No entanto, para a filogenia de Keap1 (Fig. 8) as taxas de substituição de aminoácidos mostraram-se semelhantes entre os vertebrados e os moluscos.

Figura 7. Análise filogenética da proteína de Nrf2 de *Crassostrea gigas* e espécies selecionadas.



Alinhamento múltiplo das sequências da proteína Nrf2 de *Crassostrea gigas* (*Cgigas*) contra àquelas de algumas espécies de moluscos e vertebrados pré-selecionados. Dentre eles: *Octopus bimaculoides* (Obimaculoides), *Biomphalaria glabrata* (Bglabrata), *Danio rerio* (Drerio), *Homo sapiens* (Hsapiens) e *Xenopus laevis* (Xlaevis). Foi adicionado a análise a região CNC da proteína homóloga Nrf2 em *Drosophila melanogaster* (isoforma A). Os correspondentes números de acesso à sequência GenBank são os seguintes: *C. gigas* XP_011417894.1; *B. glabrata* XP_013066639.1; *O. bimaculoides* Nrf2: XP_014784777.1; *H. sapiens* Nrf2: NP_006155.2; *D. rerio* Nrf2: NP_878309.1; *X. laevis* Nrf2: NP_001079522.1; *D. melanogaster* NP_732835.1. A análise foi baseada na árvore de máxima verossimilhança e o comprimento do ramo é proporcional à taxa de substituição de aminoácidos esperada. A barra de escala representa 0,4 substituições de aminoácidos esperadas por região.

Figura 8. Análise filogenética da proteína de Keap1 de *Crassostrea gigas* e espécies selecionadas.

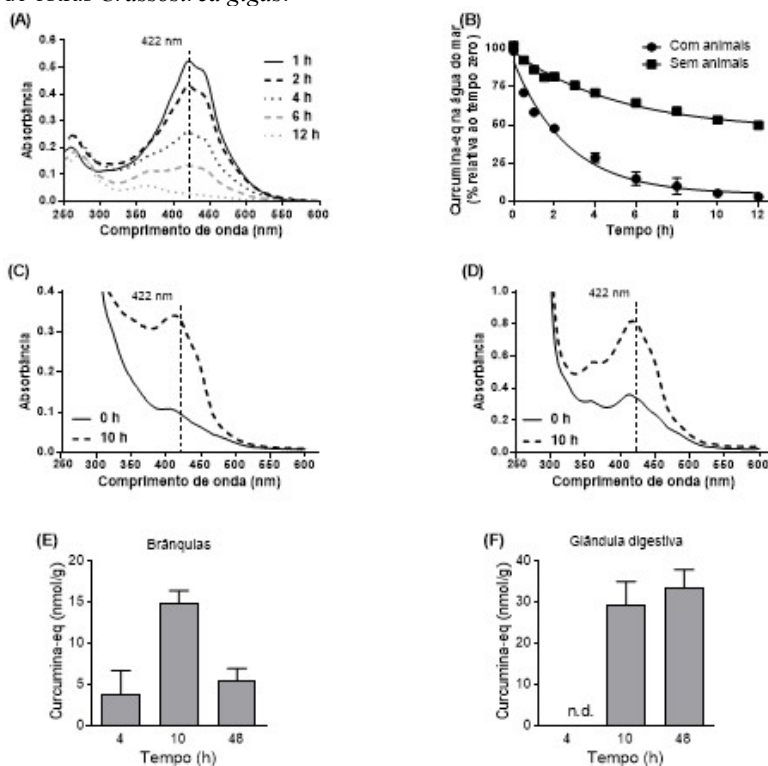


Alinhamento múltiplo das sequências de proteína Keap1 de *Crassostrea gigas* (Cgigas) contra àquelas de algumas espécies de moluscos e vertebrados pré-selecionados. Dentre eles: *Octopus bimaculoides* (Obimaculoides), *Biomphalaria glabrata* (Bglabrata), *Danio rerio* (Drerio), *Homo sapiens* (Hsapiens) e *Xenopus laevis* (Xlaevis). Os correspondentes números de acesso à sequência GenBank são os seguintes: *C. gigas* XP_011431859.1; *A. californica* XP_005111529.1; *B. glabrata* XP_013073773.1; *O. bimaculoides* XP_014782077.1; *H. sapiens* NP_036421.2; *D. rerio* NP_001106948.1; *X. laevis* NP_001088949.1; *D. melanogaster* AAF55386.1. A análise foi baseada na árvore de máxima verossimilhança e o comprimento do ramo é proporcional à taxa de substituição de aminoácidos esperada. A barra de escala representa 0,3 substituições de aminoácidos esperadas por região.

4.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM CURCUMINA

Os níveis de curcuminoides foram determinados na água do mar e tecidos (brânquia e glândula digestiva) de ostras *C. gigas* durante a exposição a 30 μ M de curcumina. Na presença de animais, o espectro de absorvância da curcumina na água do mar diminui progressivamente ao longo do tempo, o que pode ser facilmente seguido pela diminuição da absorvância em 422 nm, onde a absorvância da curcumina é máxima (Fig. 9A). Nestas circunstâncias, a absorvância em 422 nm atingiu valores próximos de zero (3-4%) após 10 h de exposição (Fig. 9B, círculos). Na ausência de ostras, a absorvância em 422 nm sofre uma diminuição espontânea demasiadamente lenta, atingindo cerca de 50% dos valores iniciais após 10 h (Fig. 9B, quadrados). A presença de animais aumentou a taxa de desaparecimento inicial de absorvância por um fator de três ou mais.

Figura 9. Equivalentes de curcumina (curcuminoides) na água do mar e tecidos de ostras *Crassostrea gigas*.



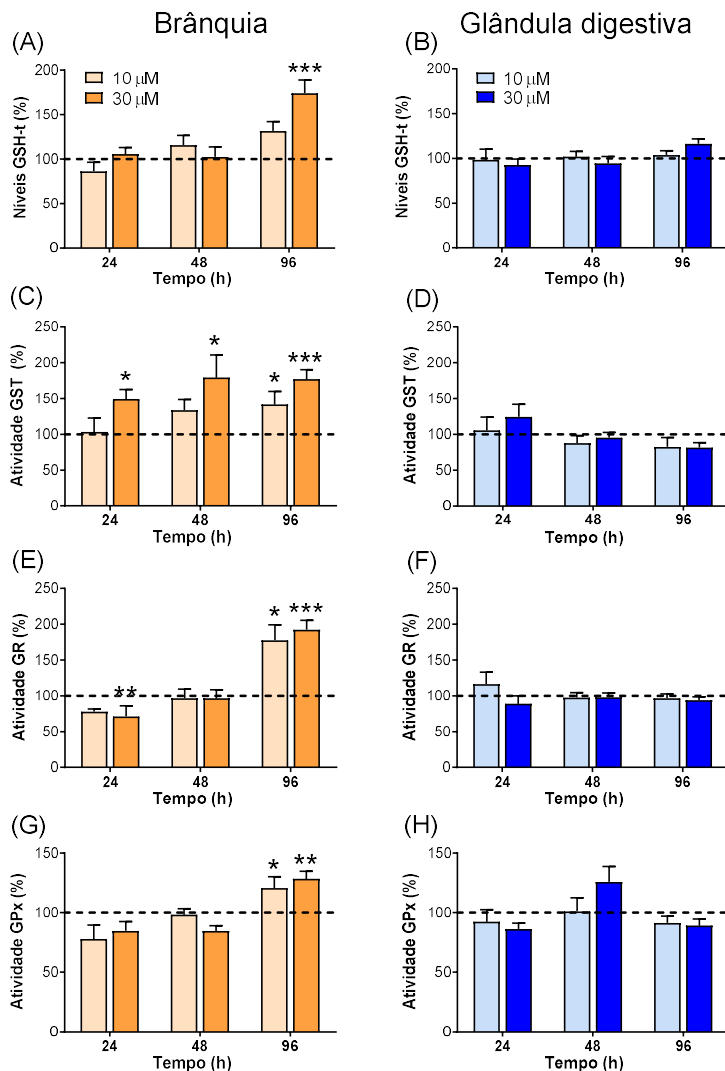
Os animais foram expostos a curcumina $30 \mu\text{M}$ durante 48 h, sem renovação de água. Dada a instabilidade da curcumina em solução aquosa e o possível metabolismo tecidual após a absorção, não podemos especificar se a absorbância está relacionada à curcumina ou seus metabólitos. Por esta razão, os dados são apresentados como equivalentes de curcumina ou curcuminoides. (A) Durante a exposição, foram recolhidas aliquotas de água do mar e a absorbância foi analisada por espectrofotometria nos tempos indicados. (B) A percentagem de equivalentes de curcumina foi determinada utilizando o pico de absorbância de 422 nm na presença (círculos) ou ausência (quadrados) de ostras e normalizadas para a absorbância no tempo zero ($n = 3$). (C-F) Foram também determinados equivalentes de curcumina nas brânquias e na glândula digestiva ($n = 5-6$) após extração em fase líquida com acetato de etila/metanol. São mostradas varreduras representativas para o controle não exposto (linhas contínuas) e após 10 h de exposição à curcumina (linhas tracejadas) nas brânquias (C) e na glândula digestiva (D). Os equivalentes de curcumina nos tecidos foram estimados usando uma curva padrão em acetato de etila/metanol para as brânquias (E) e (F) para a glândula digestiva. Os dados são apresentados como média + EPM.

Os curcuminoides foram detectados nos tecidos de *C. gigas* após exposição de 30 μM de curcumina durante 4, 10 e 48 h (Fig. 9C-F). A curcumina é instável em solução aquosa (ESATBEYOGLU et al., 2012), e após a absorção, uma metabolização não pode ser descartada. Por esta razão, os valores são apresentados como equivalentes de curcumina. Os espectros de absorção das amostras de brânquia (Fig. 9C) e de glândula digestiva (Fig. 9D), após exposição à curcumina por 10 h, ilustram a grande diferença de absorbância devido à presença de curcuminoides. Houve acúmulo de curcuminoides na brânquia 4 h após o início da exposição (Fig. 9E), mas não na glândula digestiva (Fig. 9F). Dez horas após o início da exposição, a absorbância em 422 nm da amostra de tecidos de ostras expostas a curcumina foi muito maior do que os valores basais obtidos de animais controle para brânquias (Fig. 9C e E) e glândula digestiva (Fig. 9D e F). Após 48 h de exposição, os curcuminoides diminuem suas concentrações na brânquia, mas não na glândula digestiva.

Com base nos dados obtidos, os curcuminoides acumulam-se primeiro (4 h) nas brânquias (~ 4 nmol/g), apresentando um máximo após 10 h (~ 15 nmol/g) e diminuindo (48 h) até cerca de 5 nmol/g (Fig. 9E). Na glândula digestiva, os curcuminoides foram detectados pela primeira vez após 10 h de exposição, atingindo cerca de 30 nmol/g (Fig. 9F), que permaneceu estável durante pelo menos 48 h. Após 48 h de exposição, os níveis de curcumina foram 6 vezes mais elevados na glândula digestiva quando comparados com as brânquias. Além disso, torna-se claro a acumulação inicial às 4 h, atingindo estabilidade entre 10 e 48 h, indicando que a curcumina ou seus metabólitos não podem ser facilmente excretados ou que as ostras retêm ativamente curcuminoides.

A exposição das ostras a 10 ou 30 μM de curcumina durante 96 h induziu um aumento acentuado em várias defesas antioxidantes nas brânquias (Fig. 10). Diferenças significativas foram observadas após 96 h de exposição, incluindo aumento nos níveis de GSH-t (Fig. 10A), bem como na atividade GST, GR e GPx (Fig. 10C, E e G, respectivamente). Curiosamente, a atividade GST nas brânquias aumentou rapidamente (24 h) após a exposição à curcumina (30 μM), permanecendo elevada durante pelo menos 96 h (Figura 10C). Antes do aumento de atividade após 96 h, a atividade de GR diminuiu no início da exposição a 30 μM de curcumina (24 h), seguida de restabelecimento após 48 h (Fig. 10E). Essas mesmas defesas antioxidantes, quando analisadas na glândula digestiva, não foram alteradas pela exposição à curcumina, independentemente da concentração utilizada (Fig. 10B, D, F e H).

Figura 10. Defesas antioxidantes nas brânquias e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas a curcumina.

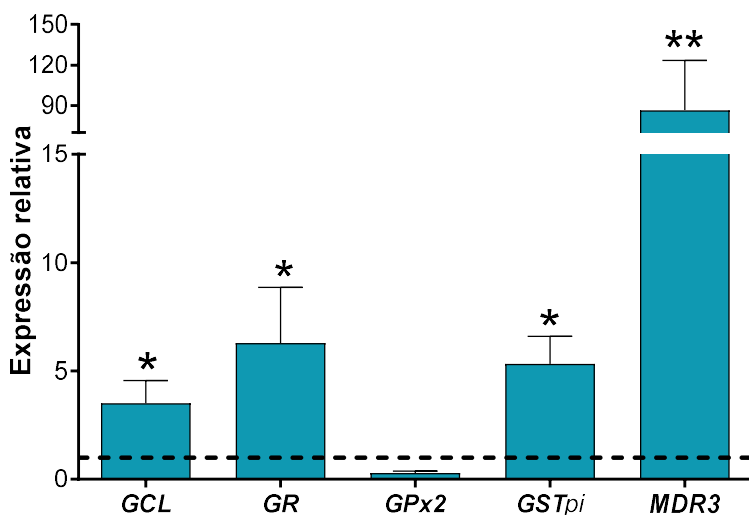


Os animais foram expostos a curcumina (10 ou 30 μM) durante o período indicado. As brânquias (esquerda) e a glândula digestiva (direita) foram analisadas para os níveis totais de glutatona (GSH-t, A e B) e a atividade da glutatona S-transferase (GST, C e D), glutatona redutase (GR, E e F) e glutatona peroxidase

(GPx, G e H). Devido à variabilidade entre experimentos, os dados são apresentados como percentagem relativa aos valores do grupo controle (linha tracejada). As médias foram obtidas (\pm EPM) a partir de pelo menos 15 animais de 2-3 experimentos, exceto durante 24 h que foram de um único experimento com 6-8 animais ($n= 15-24$). A média dos níveis de glutathione foi $\text{GSH-t } 1,50 \pm 0,1$ para brânquias e $1,70 \pm 0,1$ ($\mu\text{mol/g}$) para glândula digestiva. A atividade basal das enzimas, em nmol/min/mg , foi: GST $87,3 \pm 8,50$; GR $13,0 \pm 1,40$; GPx $3,10 \pm 0,20$ para brânquias, e GST $30,7 \pm 2,50$; GR $16,7 \pm 1,20$; GPx $3,20 \pm 0,20$ para a glândula digestiva. As diferenças significativas em relação ao grupo de controle (linha tracejada) são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os dados foram analisados por análise de variância de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Duncan, quando necessário.

Levando em conta que o tratamento com curcumina produziu um aumento em várias defesas antioxidantes nas brânquias, nós partimos da hipótese que a curcumina aumentaria os níveis de transcrição de vários genes conhecidos como sendo alvo de regulação pelo fator de transcrição Nrf2 (Fig. 11). O número relativo de cópias de mRNA de GCL (subunidade catalítica), enzima limitante de velocidade na síntese de GSH; bem como para enzimas antioxidantes GR, GPx2 e GST*pi* foram avaliadas nas brânquias das ostras 24 h após o tratamento com curcumina ($30 \mu\text{M}$). Conforme ilustrado na Figura 11, a exposição à curcumina durante 24 h aumentou os níveis de transcrição de GCL, GR e GST*pi*, mas não os de GPx2. A exposição à curcumina também induziu um aumento acentuado nos níveis de transcrição de MDR3 (Fig. 11), um produto gênico conhecido por transportar vários substratos de MDR1 e p-glicoproteína, tais como digoxina, paclitaxel e vinblastina (SMITH et al., 2000).

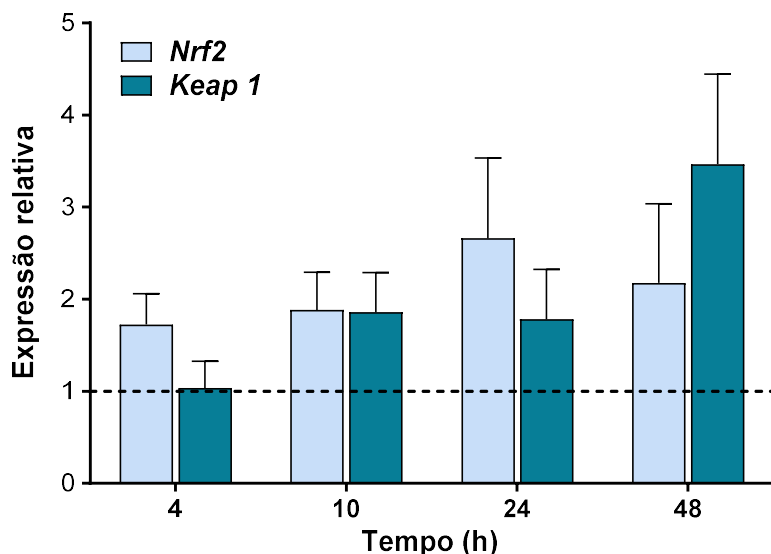
Figura 11. Efeito da exposição à curcumina na expressão relativa dos genes selecionados em brânquias de ostras *Crassostrea gigas*.



Após exposição à 30 μM de curcumina durante 24 h, as brânquias foram analisadas por RT-qPCR para avaliar os níveis de expressão relativa dos seguintes genes: glutamato-cisteína ligase subunidade catalítica (GCL); glutathione redutase (GR); glutathione peroxidase 2-like (GPx2); glutathione S-transferase *pi*-like (GST *pi*); e proteína multirresistência 3-like (MDR3). Os dados são apresentados como média \pm EPM ($n=5$). As diferenças significativas em relação ao grupo de controle são indicadas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Dada a resposta dos parâmetros antioxidantes ao nível bioquímico e molecular, esperávamos que o Nrf2 em si pudesse ser induzido pela curcumina. No entanto, o número de cópias de mRNA do Nrf2 não foi alterado pela exposição à curcumina 30 μM , em nenhum dos tempos testados (4, 10, 24 e 48 h) (Fig. 12). Keap1 é um regulador negativo de Nrf2 e, normalmente, sua expressão é diminuída quando a expressão e atividade de Nrf2 são induzidas (XU et al., 2016). No entanto, da mesma forma que o Nrf2, a exposição à curcumina 30 μM não alterou os níveis de mRNA de Keap1 (Fig. 12).

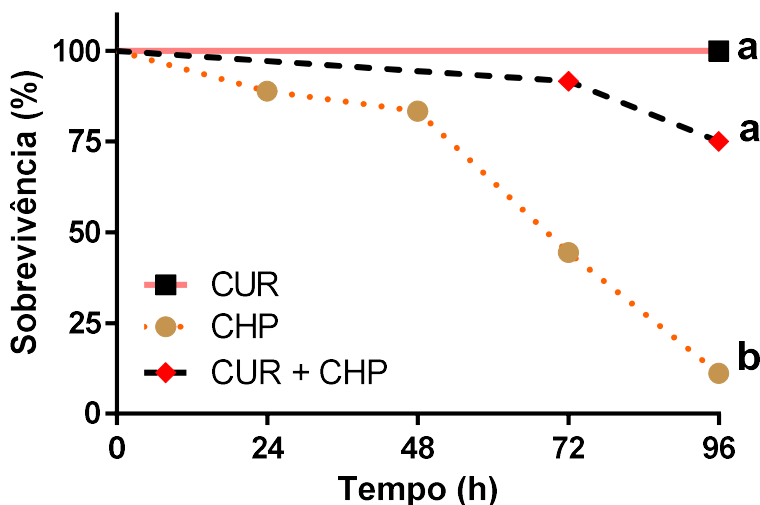
Figura 12. Efeito da exposição à curcumina na expressão relativa de Nrf2 e Keap1 em brânquias de *Crassostrea gigas*.



Após a exposição à 30 μM de curcumina durante o período indicado, as brânquias foram analisadas por RT-qPCR para os níveis relativos de mRNA dos seguintes genes: Nrf2 e Keap1. Os dados são apresentados como média + EPM ($n=5$). Não foram detectadas diferenças significativas em relação ao grupo controle.

A fim de investigar se esta indução de defesas antioxidantes poderia aumentar a resistência contra o estresse oxidativo, ostras foram pré-tratadas com curcumina 30 μM durante 96 h, seguidas por uma exposição a hidroperóxido de cumeno (CHP) 3 mM durante um período adicional de 96 h (Fig. 13). A exposição à CHP reduziu drasticamente a taxa de sobrevivência para 11% ao final da exposição de 96 h. A curcumina sozinha não causou mortalidade, contudo, o pré-tratamento com curcumina aumentou a taxa de sobrevivência de ostras expostas a CHP 3 mM, que passou de 11% para 75% de sobrevivência. O teste estatístico indicou que a taxa de sobrevivência de ostras tratadas com curcumina é significativamente diferente daquela dos animais controle não tratados.

Figura 13. O pré-tratamento com curcumina aumenta a taxa de sobrevivência das ostras *Crassostrea gigas* expostas à hidroperóxido de cumeno.



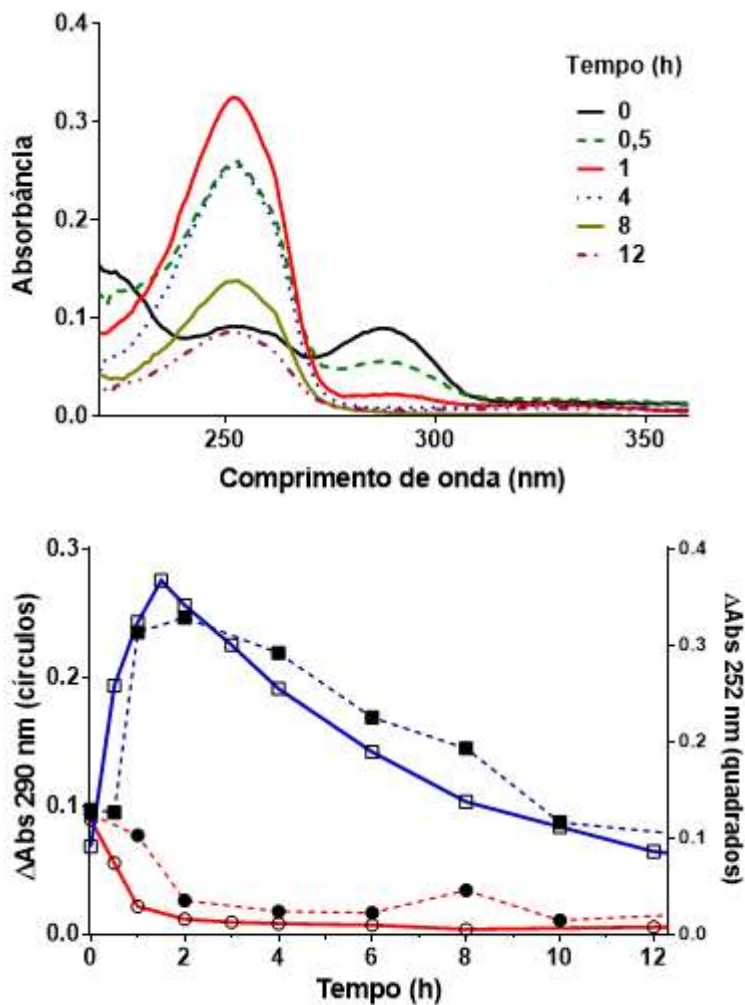
Os animais foram pré-tratados com curcumina 30 μM (CUR) durante 96 h e expostos adicionalmente a hidroperóxido de cumeno (CHP, 3 mM) durante um período adicional de 96 h (CUR + CHP). As ostras também foram expostas apenas a CHP 3 mM ou mantidas em água do mar limpa durante 96 h após a exposição à curcumina, tratados somente com curcumina ou água do mar (dados não mostrados). Os grupos foram comparados estatisticamente utilizando um teste *Log-rank* (*Mantel-Cox*). Os grupos com letras distintas são estatisticamente diferentes com $p < 0,05$ ($n = 12$).

4.3. EFEITOS DO TRATAMENTO COM tBHQ

Os níveis de tBHQ foram determinados na água do mar e tecidos de ostras *C. gigas* durante a exposição à 30 μM de tBHQ. Este composto tem absorção máxima em 290 nm. A absorbância foi máxima no tempo zero, desaparecendo em pouco mais de uma hora (Fig. 14 A), sugerindo uma rápida degradação da tBHQ. Com o mesmo perfil temporal, houve um aumento na absorbância em 252 nm. O espectro UV da água do mar na presença de tBHQ, teve um máximo de absorbância, uma hora após o início do experimento. Nos demais tempos (4, 8 e 12 h), houve um progressivo decréscimo na absorbância em 252 nm. A absorbância em 252 nm representa o aparecimento (até 1 h) e degradação (1 a 12 h) do metabólito da tBHQ denominado de 2-tert-butil-1,4-benzoquinona (tBBH), de

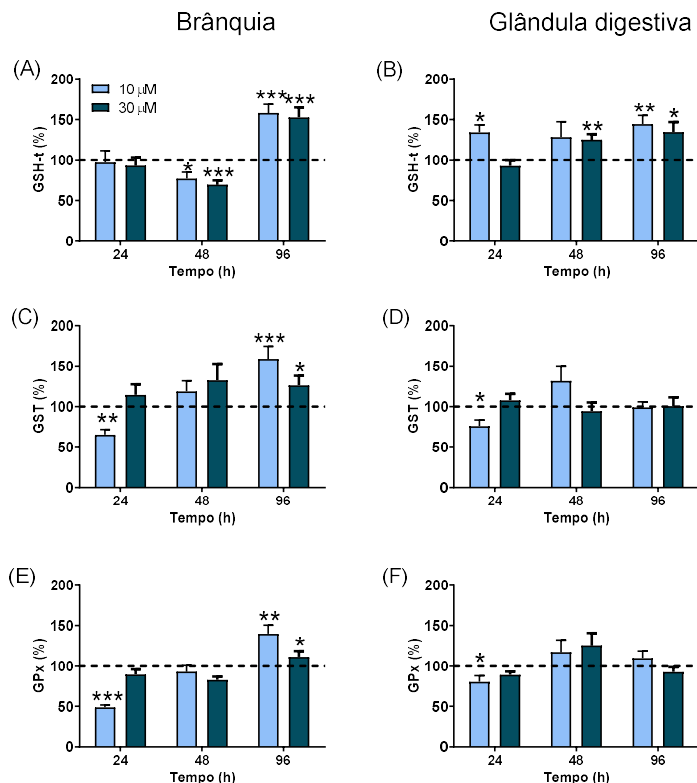
acordo com dados da literatura (OOI et al., 2013). Os perfis temporais das absorvâncias em 290 e 252 nm estão representadas na Figura 14B. As linhas cheias representam os espectros de absorvância da água do mar na presença de tBHQ, enquanto as linhas pontilhadas representam esta mesma variação na presença de animais. A presença de animais não interferiu significativamente na variação de absorvância ao longo do tempo.

Figura 14. Variação da absorbância na água do mar após a adição de tBHQ.



Os animais foram expostos à tBHQ 30 μ M durante 12 h, sem renovação de água. Durante a exposição, foram recolhidas alíquotas de água do mar e a absorbância foi analisada entre 200 e 600 nm (nos tempos indicados). Os níveis de tBHQ e os metabólitos foram determinados utilizando o pico de absorbância de 252 e 290 nm, círculos e quadrados, respectivamente. Linhas representam análises do composto sem os animais e traços representam análises do composto com os animais.

Figura 15. Defesas antioxidantes nas brânquias e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas à tBHQ.



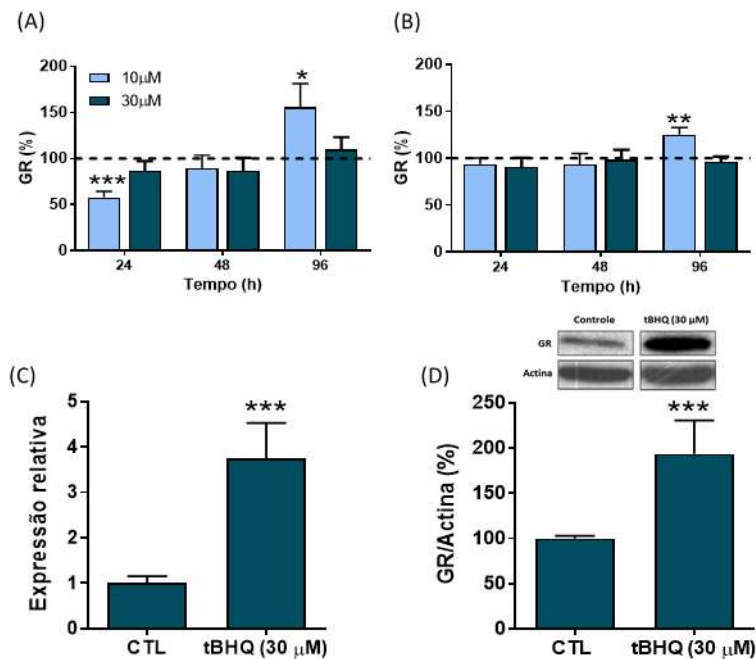
As ostras foram expostas a 10 ou 30 μ M nos tempos indicados as brânquias (esquerda) e glândula digestiva (direita) foram analisadas quanto aos níveis de glutatona total (A e B), atividade glutatona S-transferase (GST, C e D) e glutatona peroxidase (GPx, E e F). As diferenças significativas em relação ao grupo de controle (linha tracejada) são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguindo o teste *post hoc* de *Dunnet*, quando necessário. As médias (\pm EPM) foram obtidas de pelo menos 15 animais de 2-3 experiências, com exceção de 24 h que foram de uma única experiência com 6-7 animais ($n = 6-7$). A média dos níveis de glutatona foram GSH-t $1,50 \pm 0,1$ para brânquias e $1,70 \pm 0,1$ (μ mol/g) para a glândula digestiva. A atividade basal das enzimas, em nmol/min/mg, foram: GST $87,3 \pm 8,50$, GPx $3,10 \pm 0,20$ para brânquias, e GST $30,7 \pm 2,50$, GPx $3,20 \pm 0,20$ para a glândula digestiva.

Defesas antioxidantes foram avaliadas pois estão relacionadas com a ativação do fator de transcrição Nrf2, tendo sido já relatado na literatura que este fator de transcrição é ativado pela tBHQ (GUERRO-BELTRÁN et al., 2012). A atividade de três enzimas antioxidantes e os níveis de GSH-t foram aumentados pelo tratamento com tBHQ após 96 h na brânquia, e em menor extensão na glândula digestiva (Fig. 15 e 16). A atividade das enzimas e os níveis de GSH-t aumentaram após 96 h de exposição, em ambas as concentrações (Fig. 15), com exceção da atividade GR que não aumentou na concentração de 30 μ M (Fig. 16A).

As brânquias apresentaram melhor resposta em relação à glândula digestiva, 96 h após início do tratamento com tBHQ (Fig. 15 e 16). Na glândula digestiva houve um aumento nos níveis de GSH-t após 48 e 96 h, 30 μ M (Fig. 15B). Não houve aumento na atividade das enzimas GST e GPx na glândula digestiva, enquanto que a atividade GR aumentou em 96 h e na concentração de 10 μ M de tBHQ (Fig. 16B). Contudo, nas brânquias houve diminuição nos níveis de GSH em 48 h (10 e 30 μ M), e nas atividades GST, GPx e GR em 24 h (10 μ M). As atividades GST e GPx na glândula digestiva também foram diminuídas significativamente 24 h após exposição à tBHQ 10 μ M.

Ao analisarmos a atividade enzimática GR nas brânquias das ostras observamos um aumento significativo após 96 h de exposição à tBHQ 10 μ M (Fig. 16A). O mesmo aumento foi observado para a atividade GST e GPx, porém, este aumento não foi observado na concentração de 30 μ M. Assim, para verificar esta discrepância nos dados, os níveis de mRNA da GR foram medidos, mostrando um aumento de 3,8 vezes 24 h após exposição à tBHQ (Fig. 16C). Os níveis relativos da proteína GR também foram avaliados por *Western blot*, confirmando um aumento de cerca de 2 vezes (Fig. 16D).

Figura 16. Efeito da exposição à tBHQ na expressão relativa do mRNA, na atividade e concentrações de proteína de enzima GR.

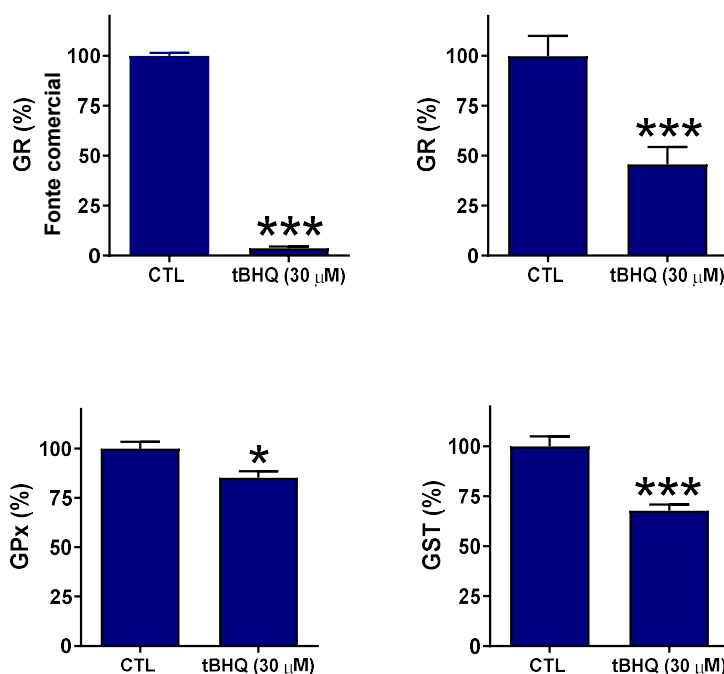


Ostras *Crassostrea gigas* foram expostas a 10 ou 30 μM, após 24, 48 e 96 h a atividade da GR foram analisadas nas brânquias (A) e na glândula digestiva (B). A atividade basal da GR (nmol/min/mg) foi de $13,0 \pm 1,40$ para as brânquias e de $16,7 \pm 1,20$ para a glândula digestiva. Os dados foram analisados por análise de variância, seguido pelo teste *post hoc* de *Duncan*. (C) Após exposição à tBHQ 30 μM, as brânquias foram analisadas por RT-qPCR para os níveis relativos de mRNA da GR (n= 5). (D) Após 96 h de exposição à tBHQ 30 μM as proteínas das brânquias foram analisadas por *Western blot* para GR e β -actina. Painel superior, imagem representativa de bandas não adjacentes da mesma membrana. As diferenças estatísticas nos níveis relativos de mRNA e proteína foram detectadas por teste *t* não paramétrico. Os dados são apresentados como média \pm EPM. As diferenças significativas em relação ao grupo controle são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Uma vez que os dados da Figura 16 indicam que possa haver uma inibição da atividade GR, e que nos tempos iniciais (24 h) de exposição à tBHQ foram observadas diminuições nas atividades GST, GPx e GR, decidimos fazer um experimento *in vitro*. O objetivo do experimento foi verificar se a presença de tBHQ (30 μM) por 4 h levaria a inibição das

enzimas estudadas. O primeiro experimento verificou se a enzima GR purificada de fonte comercial (Sigma-Aldrich, São Paulo) seria inibida pela presença de tBHQ, e de fato somente a atividade residual (<5%) foi encontrada após o tratamento (Fig. 17A). Da mesma forma, o extrato de brânquia apresentou uma diminuição de 54% na atividade GR (Fig. 17B), de 32% na atividade GST (Fig. 17C) e de 15% na atividade GPx (Fig. 17D). Estes dados indicam que a tBHQ ou seus metabólitos são capazes de inibir *in vitro* as três enzimas estudadas.

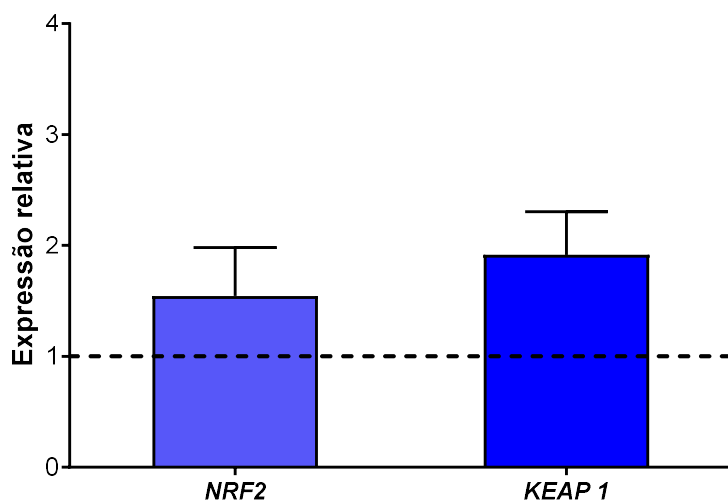
Figura 17. Teste de inibição enzimática *in vitro* por tBHQ



Ensaio da atividade da GR com amostras de GR de fonte comercial (A) incubadas com 30 μ M de tBHQ à temperatura ambiente durante 4 h. Extratos de brânquia de *C. gigas* também foram incubadas com 30 μ M de tBHQ (temperatura ambiente) e após 4 h foi medido a atividade para GR (B), GPx (C) e GST (D). Os dados são apresentados como média \pm EPM. As diferenças significativas em relação ao grupo controle são indicadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Após a ativação, o fator de transcrição Nrf2 acumula no citoplasma e é transportado para o núcleo, onde liga-se à região promotora dos genes que contém ARE. O próprio Nrf2 tem ARE na sua região promotora. Assim, Nrf2 é muitas vezes medido por um aumento nos níveis de seu mRNA (BRYAN et al., 2013; KALTHOFF et al., 2010). Embora houvesse indução das defesas antioxidantes avaliadas, o Nrf2 não apresentou alterações nos níveis de mRNA (Fig. 18), apesar da tBHQ ser uma conhecida indutora de Nrf2. Da mesma forma, não houve alteração nos níveis de mRNA de Keap1 24 h após a exposição à tBHQ (Fig. 18).

Figura 18. Efeito da exposição à tBHQ na expressão relativa dos genes Nrf2 e Keap1 nas brânquias das ostras *Crassostrea gigas*.

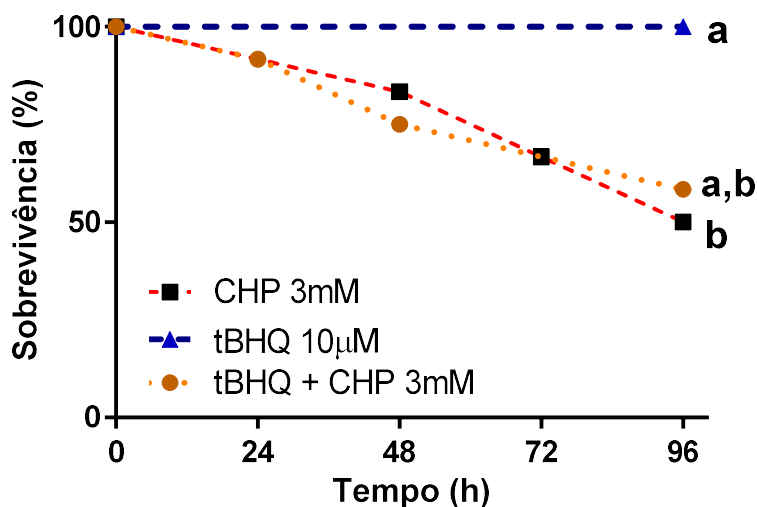


Após exposição à 30 μ M de tBHQ, as brânquias foram analisadas por RT-qPCR para os níveis de transcrição dos genes Nrf2 e Keap1. Os dados são apresentados como média + EPM (n= 5).

Uma curva de sobrevivência (Fig. 19) foi construída para inferir se a tBHQ poderia proporcionar resistência ao estresse oxidativo. Inicialmente as ostras foram pré-tratadas com tBHQ 10 μ M durante 96 h, acompanhadas por uma exposição a hidróperóxido de cumeno (CHP) 3 mM durante um período adicional de 96 h. O controle positivo, ou seja, a exposição a CHP causou uma mortalidade de 50%, ao final da exposição de

96 h. Quando analisamos o CHP com o pré-tratamento com tBHQ os resultados não foram muito diferentes dos animais tratados com CHP, pois a taxa de sobrevivência de ostras expostas ao CHP 3 mM, passou de 50% para 58% na presença de tBHQ.

Figura 19. Taxa de sobrevivência de ostras *Crassostrea gigas* pré-tratadas com tBHQ e expostas à hidroperóxido de cumeno.



Os animais foram pré-tratados com tBHQ 10 µM durante 96 h e expostos adicionalmente a hidroperóxido de cumeno (CHP 3 mM) durante um período adicional de 96 h (tBHQ + CHP). As ostras também foram expostas apenas a CHP 3 mM ou mantidas em água do mar limpa durante 96 h após a exposição à tBHQ. Não foi observada mortalidade em animais do controle tratados somente com tBHQ ou água do mar (dados não mostrados). Os grupos foram comparados estatisticamente utilizando um teste *Log-rank (Mantel-Cox)*. Os grupos com letras distintas são estatisticamente diferentes com $p < 0,05$ ($n = 12$).

5. DISCUSSÃO

Dentre os indutores de Nrf2 mais conhecidos em modelos de mamíferos (ESATBEYOGLU et al., 2012), selecionamos curcumina e tBHQ por serem dois fortes indutores. Ostras foram expostas a estes indutores e as defesas antioxidantes foram avaliadas nas brânquias e na glândula digestiva da ostra do Pacífico. Foram selecionadas estes dois tecidos por serem os mais relacionados ao metabolismo de ERO e de substâncias eletrofílicas (LÜCHMANN et al., 2014; TREVISAN et al., 2014b, 2016)

5.1. TRATAMENTO COM CURCUMINA

Ao avaliarmos a relação de absorção e o metabolismo da curcumina, os resultados sugerem que as ostras são capazes de grande absorção de curcuminoides presentes na água do mar. Aparentemente há um acúmulo transitório nas brânquias, antes que estes possam ser detectados na glândula digestiva. Além disto, os níveis de curcuminoides diminuíram progressivamente na brânquia, e ao contrário na glândula digestiva, houve acúmulo progressivo. Este fato pode ser explicado, pelo maior contato da brânquia com a água do mar devido à sua grande superfície e por estar na interface com o meio externo. Houve maior acúmulo e permanência de curcuminoides na glândula digestiva (10 – 96 h). Os níveis máximos de curcuminoides foram detectados em ambos os tecidos após 10 h de exposição à curcumina, o que é totalmente compatível com o desaparecimento praticamente total da curcumina da água do mar e com a ativação transcricional de vários genes antioxidantes nas brânquias, o que foi observado 24 h após o desafio. Em 48 h houve um grande decréscimo nos níveis de curcuminoides na brânquia, mas não na glândula digestiva, indicando que a curcumina, ou seus metabólitos, não podem ser facilmente excretados da glândula digestiva, ou que as ostras podem acumular curcumina na glândula digestiva. Entretanto, os mecanismos responsáveis por esta distribuição de curcuminoides ainda são desconhecidas.

Levando em conta que o tratamento com curcumina produziu um aumento em várias defesas antioxidantes nas brânquias, hipotetizamos que a curcumina aumentaria os níveis de transcrição de vários genes-alvo, potenciais do fator de transcrição Nrf2 (Fig. 11). O número relativo de cópias de mRNA de GCL (subunidade catalítica), a enzima limitante de velocidade na síntese de GSH, bem como, as enzimas antioxidantes GR, GPx2 e GST*pi* aumentaram nas brânquias das ostras, 24 h após o tratamento com curcumina (30 μ M, Fig. 11). A exposição à curcumina

também induziu um aumento acentuado nos níveis de transcrição de MDR3 (Figura 11), um produto gênico que foi avaliado por transportar vários substratos de MDR1 e p-glicoproteína, tais como digoxina, paclitaxel e vinblastina (SMITH et al., 2000). Estes dados estão de acordo com as análises bioquímicas. Os níveis mais elevados de transcrição da enzima limitante da velocidade na síntese de GSH (GCL) corroboram com os níveis aumentados de GSH nas brânquias. Os níveis de transcrição e a atividade de GR foram também induzidos pela curcumina, bem como, a atividade de GST e aumento de transcritos de GST π . Estes dados corroboram com a hipótese inicial de que a curcumina é capaz de ativar a transcrição de genes alvo de Nrf2 em ostras.

O pré-tratamento com curcumina durante 96 h aumentou a resistência da ostra ao hidroperóxido de cumeno, reduzindo drasticamente sua mortalidade. Inferimos que a indução de defesas antioxidantes dependente de curcumina contribuiu para uma maior sobrevivência de ostras. Esta suposição está de acordo com os dados da literatura que mostram que a curcumina é capaz de induzir atividade antioxidante em uma variedade de modelos animais através da via Nrf2, levando a uma resistência aumentada à oxidação, bem como uma série de outros insultos (ESATBEYOGLU et al., 2012; KIM; KEUM, 2016; LI et al., 2015), entretanto não há outros relatos de proteção em moluscos.

5.2. TRATAMENTO COM TBHQ

tBHQ é um indutora clássica da via do Nrf2, assim como a curcumina. Com doses na ordem 5 – 30 μ M, o tratamento com tBHQ induz proteção através de ativação da resposta antioxidante. Em estudos onde células T humanas em cultura primária foram tratadas com tBHQ, houve indução da expressão de mRNA dos genes alvo de Nrf2: HMOX-1, GCLC e NQO1. Este tratamento também aumentou a expressão do mRNA de Nrf2 (TURLEY; ZAGORSKI; ROCKWELL, 2015). tBHQ é igualmente associado à indução das defesas antioxidantes em peixes. Em um estudo houve aumento transcricional de genes-alvo do Nrf2, tais como GCLC e Nrf2a, em resposta ao estresse oxidativo em embriões de *Danio rerio* (HAHN et al., 2014).

Apesar de seu efeito protetor, a metabolização de tBHQ pode levar a ciclos redox gerando grande quantidade de ERO. Um dos mecanismos mais conhecidos responsável pela ativação do Nrf2 envolve a oxidação de resíduos de cisteína em regiões específicas do Keap1. Neste sentido, tBHQ pode ter ciclos de formação quinona/semiquinona, e consequentemente produção do ânion superóxido, levando à estresse oxidativo

leve e, possivelmente, é o responsável pela ativação da via Nrf2/ARE (IMHOFF; HANSEN, 2010).

A alteração da absorbância de tBHQ na água do mar iniciou-se no tempo zero com um pico em 290 nm, revelando um segundo pico em 252 nm cerca de 1-2 h após o princípio do experimento. Estes dados sugerem que há uma conversão rápida de tBHQ para 2-terc-butil-1,4-benzoquinona (tBBH) (OOI et al., 2013). É razoável propor que os efeitos observados foram desencadeados pelos metabólitos de tBHQ, devido à instabilidade conhecida de tBHQ em água e em fluidos biológicos (HUANG; GU; NIU, 2008; OOI et al., 2013; SANIDAD et al., 2016), e as respostas de amplificação de defesas antioxidantes observadas quase que exclusivamente 96 h após o início do tratamento. Outro indício é que, na presença das ostras, a absorbância de tBHQ na água do mar não foi alterada. Entretanto, com uma faixa de absorção tão próxima ao espectro de leitura de UV, não foi possível detectar tBHQ e seus metabólitos, o que poderia contribuir para o esclarecimento desta questão.

Os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com tBHQ regula positivamente a atividade de GST e GPx na brânquia, assim como descrito em animais mais derivados, possivelmente, promovendo a ativação de genes controlados pelo fator de transcrição Nrf2 (ZENG et al., 2016; ZHU et al., 2005). No entanto, verificou-se que tBHQ teve efeito menos intenso na glândula digestiva, sugerindo que a brânquia é mais afetada pelo tBHQ. Este efeito intensificado na brânquia pode estar relacionado a rápida metabolização de tBHQ que leva a formação de uma quinona/semiquinona. Esta é conjugada com GSH pela enzima GST para que possa ser eliminada pelo organismo (IMHOFF; HANSEN, 2010).

Estudos anteriores relataram que, assim como a tBHQ, outros fármacos são potentes indutores de síntese de GSH via ativação de Nrf2. Ao avaliarmos esta molécula, importante reguladora do estado redox da célula, observamos um aumento significativo nas brânquias e glândula digestiva dos animais tratados com tBHQ após 96 h. Em embriões de *Danio rerio*, temos efeitos contraditórios no estado redox de GSH, entretanto, há um aumento transcricional de GCL, enzima limitante da formação de GSH, que é dependente de tBHQ (HAHN et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2009).

De maneira similar à GST e GPx, encontramos um aumento na atividade enzimática da GR nas brânquias após 96 h de exposição à tBHQ (10 μ M), que também foi alterada na glândula digestiva. Entretanto, a GR não aumentou sua atividade na exposição a concentração de 30 μ M de tBHQ. Para testar esta falta de aumento na

atividade GR na concentração de 30 μM de tBHQ, decidimos avaliar se estes dados se refletiam ao analisarmos os níveis de mRNA e proteína desta enzima. Um aumento de aproximadamente 4 vezes foi encontrado nos níveis transcricionais do mRNA de GR 24 h após o tratamento com tBHQ 30 μM . Enquanto que os níveis de proteína GR também aumentaram, 2 vezes, em 96 h de exposição. Demonstrando que não houve aumento nos níveis de mRNA e proteico, partimos da hipótese que os metabólitos de tBHQ podem contribuir para a inibição da atividade enzimática GR.

Realizamos um protocolo de inibição enzimática *in vitro* em amostras de brânquias de ostra e GR comercial incubadas por 4 h com tBHQ 30 μM . Primeiramente, ao avaliarmos a inibição da atividade GR purificada por tBHQ, observamos que a atividade da enzima desaparece por completo. Similarmente, incubação com tBHQ reduziu a atividade da GR em 50% nas amostras de brânquias. A atividade GST e GPx também foram diminuídas em 32% e 15%, respectivamente.

Nossa hipótese inicial relacionando tBHQ com a inibição das enzimas estudadas foi fortemente apoiada pelos experimentos *in vitro*. Assim, hipotetizamos que houve inibição da atividade enzimática *in vivo*, o que é apoiado quando: a) encontrarmos atividade GR, GST e GPx diminuída na exposição dos animais a 10 μM , em 24 h; b) não houve aumento nas atividades enzimáticas na concentração de 30 μM ; c) houve aumento do mRNA e da proteína GR, mas não na sua atividade (30 μM , 96 h); e d) a atividade das 3 enzimas estudadas foi inibida *in vitro* pela exposição à tBHQ 30 μM por 4 h.

Foram analisadas as taxas de sobrevivências de ostras expostas a um estressor oxidativo, o CHP, a fim de caracterizar o efeito protetor de tBHQ mediado pela ativação da transcrição de Nrf2 e subsequente proteção antioxidante. De maneira geral, as taxas de mortalidade das ostras expostas a CHP foram relativamente altas, 50% em 96h de exposição. Com relação ao pré-tratamento com tBHQ 10 μM , este não foi capaz de reverter os danos causados por CHP. Cabe salientar que tBHQ é justamente conhecido por ser um antioxidante, com propriedades de estabilizar Nrf2 pela repressão de Keap1, o que o torna um bom protetor contra o estresse oxidativo (LI et al., 2005; ZAGORSKI et al., 2013). Em vista das inibições enzimáticas e da falta de proteção contra toxicidade de um oxidante, propõe-se que, apesar de induzir defesas antioxidantes, possivelmente tem efeitos negativos ou esta indução é insuficiente para oferecer proteção contra CHP, ao contrário do que encontramos com curcuma.

5.3. RESPOSTA NAS BRÂNQUIAS

A ampla exposição superficial com água do mar e uma alta taxa de troca nas brânquias tornam este o primeiro órgão a ser afetado por produtos químicos ambientais (HAYTON; BARRON, 1990). É razoável esperar que este órgão responda prontamente aos contaminantes ambientais, a fim de neutralizar a sua toxicidade. Em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (LÜCHMANN et al., 2014; TREVISAN et al., 2014b, 2016), bem como por outros grupos (LUCKENBACH; EPEL, 2008) sugerem que as brânquias de bivalves possuem uma barreira ambiente/tecido. Os transportadores ABC (LUCKENBACH; EPEL, 2008) e os eventos de biotransformação de fase II (TREVISAN et al., 2016) podem ser intensificados em bivalves expostos a xenobióticos. Por exemplo, a indução da síntese de GSH e a atividade e transcrição de GST por CDNB, aliada a dados biocinéticos, suportam a ideia de que as brânquias parecem ter um papel central na defesa do organismo, atuando como uma barreira metabólica efetiva contra o ataque de agentes eletrofílicos (TREVISAN et al., 2016). Se considerarmos o metabolismo de CDNB, as brânquias de ostras apresentaram taxas de conjugação extremamente altas, apresentando uma conjugação máxima de CDNB com GSH na ordem de minutos (TREVISAN et al., 2016). Portanto, é possível que a glândula digestiva acumule principalmente metabólitos de curcumina, e que estes podem não ser potentes ativadores Nrf2, em comparação com o composto original, o que precisa ser confirmado.

Vários estudos estão de acordo com a ideia de que há uma rápida indução de defesas celulares em bivalves, que ocorre predominantemente nas brânquias, em comparação com a glândula digestiva (AHMAD et al., 2011; BEBIANNO et al., 2004; CHÂTEL et al., 2012; GÉRÉRET et al., 2002; LÜCHMANN et al., 2011, 2014; MARIA; SANTOS; BEBIANNO, 2009; TREVISAN et al., 2014a; ZANETTE et al., 2008). Nossos resultados mostraram que a curcumina é primeiramente detectada nas brânquias, onde os níveis de GSH-t, as atividades de GST, GR e GPx também foram aumentados. Apesar da maior acumulação de curcuminoides em 48 h ser na glândula digestiva do que nas brânquias. O tratamento com tBHQ também levou a uma resposta mais expressiva na indução de defesas antioxidantes nas brânquias. Por outro lado, a glândula digestiva somente apresentou amplificação antioxidante no tratamento com tBHQ na atividade da GR e nos níveis de GSH-t. Para compreender completamente estas respostas teciduais, o padrão de distribuição dos compostos investigado precisa ser estudado em cada tecido, bem como confirmar que essas vias foram de fato ativadas.

5.4. PAPEL DO KEAP1 E NRF2 NAS RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DE BIVALVES

A via Nrf2/ARE está bem caracterizada em peixes e mamíferos (HAHN et al., 2015b; KOBAYASHI et al., 2009), mas quase desconhecida nos bivalves. Embora esta via não tenha sido estudado nestes organismos, as análises de alinhamento de ambas as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de Nrf2 e Keap1 de *C. gigas* indicam regiões conservadas, quando comparadas com outras espécies. Estes dados sugerem que a via de sinalização Nrf2/ARE também parece estar presente em bivalves. De fato, recentemente foi discutido que o papel de citoproteção de Nrf2 emergiu juntamente com os níveis aumentados de oxigênio atmosférico à 1.400-1.200 milhões de anos atrás. O que provavelmente ocorreu, a partir de um peptídeo eucariótico precoce contendo um domínio bZIP/CNC, aliado a uma seleção altamente refinada em animais bilaterais (GACESA et al., 2016). Embora tal análise incluísse muitas espécies preditas para conterem uma proteína Nrf2, é evidente que a via de sinalização Nrf2/ARE estará amplamente presente em espécies animais. Mesmo assim, apenas alguns deles tinham esta via validada experimentalmente, como alguns vertebrados, nematoides e artrópodes. Nosso estudo é o primeiro a investigar especificamente a via Nrf2/ARE em bivalves. Este estudo traz informações que contribuirão com estudos mecanísticos sobre estresse oxidativo e eventos de biotransformação em invertebrados.

O alinhamento da sequência de nucleotídeos de Nrf2 de *C. gigas* indicou uma identidade relativamente elevada com as sequências de Nrf1 e Nrf2 de diferentes espécies de invertebrados e vertebrados, mas com base num comprimento de sequência muito limitado. Em relação à sequência proteica, obteve-se maior cobertura, proporcionando taxas de identidade moderadas, quando comparada com espécies selecionadas de moluscos e vertebrados. A presença de um domínio conservado *cap 'n' collar* (CNC), composto de 67 aminoácidos, indica que estes genes pertencem a uma subfamília de proteínas compostas pelos p45Nfe2 e Nrf1-3. Esta mesma conclusão foi obtida pela análise em várias outras espécies, uma vez que este domínio é bem conservado em proteínas do tipo CNC de diversos ramos filogenéticos. Nossa análise filogenética agrupou tanto o Nrf2 quanto o Keap1 de *C. gigas*, juntamente com outras sequências de moluscos, mas separadas de vertebrados e artrópodes, similarmente aos modelos propostos por estudos evolutivos da via de sinalização Nrf2/ARE (GACESA et al., 2016).

Os domínios de Keap1 foram bem conservados entre espécies de diferentes táxons, com altos valores de identidade e com uma cobertura significativa da sequência de aminoácidos de *C. gigas*. Em particular, 8 resíduos de cisteína mostraram-se conservados em sequências de *C. gigas* com aquelas de várias outras espécies. Além disto, foram conservados 5 resíduos de cisteína adicionais entre as 4 espécies de moluscos. Estas cisteínas são essenciais para a função de Keap1, uma vez que algumas delas são sensores redox e transdutores de sinal para esta proteína. Este domínio redox é bem conservado ao longo da evolução (LI et al., 2008).

A presença de ambas as sequências de Nrf2 e Keap1 no genoma de *C. gigas* sugere que genes importantes relacionados com antioxidantes, biotransformação e defesas celulares poderiam ser modulados por tal via de sinalização. A ativação da sinalização de Nrf2/ARE pode ser feita pela exposição de células ou organismos a um ligeiro estresse oxidativo ou eletrofílico, conduzindo à oxidação/alquilação de cisteínas sensíveis de Keap1. Embora vários estudos indiquem a amplificação coordenada de antioxidantes em bivalves durante condições oxidativas, ainda é desconhecido se tais respostas estão relacionadas com a ativação da via de sinalização Nrf2.

A ativação direta de Nrf2 é mediada pela interação de um agente oxidativo ou eletrofílico e a proteína Keap1, ao qual faz parte de um complexo de proteínas auxiliaadoras. Com a liberação de Nrf2, este é recrutado para a cromatina para induzir a expressão genica. Em mamíferos, o controle da via Nrf2/ARE é regulado principalmente pela taxa de degradação proteossômica (Hahn et al., 2015), que ainda não foi definido em bivalves. Além disso, o Nrf2 é controlado em múltiplos níveis, incluindo a ligação Keap1/ubiquitinação/degradação do proteassoma, fosforilação, miRNA que conduz ao silenciamento de Nrf2, e regulação transcricional (KIM; KEUM, 2016; LOBODA et al., 2016; TEBAY et al., 2015). Em contrapartida as análises de expressão genica de Nrf2 são dependentes de sua autorregulação, por possuir em sua região promotora o ARE (HUANG et al., 2015). Contudo é necessária uma amplificação significativa para a detecção de um aumento transcricional de Nrf2.

No entanto, nem os níveis de transcrição de Nrf2 nem de Keap1 foram alterados pelo tratamento com curcumina. A transcrição de ambos os genes apresentou uma tendência de aumento ao longo do tempo (Fig. 12), mas como Keap1 é um regulador negativo de Nrf2, parece que a atividade de Nrf2 não é controlada pela curcumina no nível de transcrição pelo menos no intervalo de concentração de curcumina utilizado.

O tratamento com tBHQ foi baseado na sua capacidade de ativar o fator de transcrição Nrf2, conforme estudado em modelos de mamíferos (IMHOFF; HANSEN, 2010). Contudo ao investigarmos se os níveis de mRNA relativo (Fig. 18) de Nrf2 e seu modulador negativo (Keap1) foram alterados pelo tratamento com tBHQ (24 h, 30 μ M), não obtivemos níveis transcricionais diferenciados.

Apesar da curcumina e tBHQ serem indutoras clássicas da via do Nrf2/ARE (KASPAR; NITURE; JAISWAL, 2009; ZAGORSKI et al., 2013), nossos dados indicam que estes compostos não modularam transcricionalmente Nrf2, o que continua a ser desconhecido em bivalves. Neste trabalho, não foi possível estudar outros níveis de controle do Nrf2, como relacionado a migração da proteína para o núcleo, devido à falta de ferramenta metodológicas. O estudo em bivalves passa pela ausência de anticorpos comerciais e pelo reduzido número de trabalhos publicados. Muitas vezes, a inexistência das sequências completas dos genes e de suas regiões promotoras impede estudos filogenéticos mais aprofundados e o uso de RNA de interferência.

A atividade antioxidante e a indução transcricional de vários genes controlados pelo Nrf2 e a resistência ao insulto oxidativo indicam a funcionalidade do Nrf2 nos bivalves. A ausência de evidência de uma regulação transcricional de Nrf2 e Keap1 não é um forte argumento contra esta ideia, uma vez que existem vários outros mecanismos de regulação conhecidos, como o da via Ahr.

6.CONCLUSÕES

Este trabalho, de maneira geral, adicionou novas informações para o filo *Mollusca* sobre os genes Nrf2 e Keap1 e sua função em resposta ao estresse causado pela curcumina e tBHQ.

Os resultados obtidos pela exposição das ostras *Crassostrea gigas* à curcumina permitem as seguintes conclusões:

- ✓Ao avaliarmos a relação de absorção e ao metabolismo da curcumina, os resultados sugerem que as ostras são capazes de alta absorção de curcuminoides presentes na água do mar;

- ✓As brânquias produziram uma resposta clara para a curcumina, enquanto a glândula digestiva não, indicando que a brânquia é um importante tecido para o estudo da ação da curcumina;

- ✓A atividade das enzimas GST, GR e GPx e níveis de GSH, bem como o aumento nos níveis relativos do mRNA de GR, GCL, GST*Pi* e MRD3 foram induzidos por curcumina, todos conhecidos alvos do Nrf2. Estes dados apoiam a ideia de que houve ativação do Nrf2 na brânquia de ostras tratadas com curcumina;

- ✓Curcumina se mostrou um bom protetor contra o estresse oxidativo gerado por hidroperóxido de cumeno;

- ✓Os níveis de transcrição de Nrf2 nem de Keap1 não foram alterados pelo tratamento com curcumina, indicando ausência de regulação transcricional.

Com relação aos resultados da exposição das ostras *C. gigas* à tBHQ, chegamos as seguintes conclusões:

- ✓A alteração da absorbância de tBHQ corroborou com outros trabalhos, devido a sua instabilidade, rápida degradação e o aparecimento de metabólitos secundários. E com a presença das ostras esse padrão de degradação não foi alterado.

- ✓O tratamento com tBHQ levou a uma resposta mais expressiva nas brânquias, quando comparado com a resposta na glândula digestiva, indicando que a brânquia é um importante tecido para o estudo da ação do tBHQ.

- ✓Os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com tBHQ regula positivamente os níveis de GSH-t e a atividade GR, GST e GPx na brânquia, assim como descrito em animais mais derivados. Possivelmente, houve ativação de genes controlados pelo fator de transcrição Nrf2.

✓ A atividade enzimática da GR nas brânquias e na glândula digestiva aumentou após 96 h de exposição a tBHQ (10 μ M), mas não na concentração de 30 μ M. Contudo, ao analisarmos os níveis de mRNA e proteína desta enzima, observamos um aumento quando tratamos os animais com tBHQ (30 μ M). Confirmamos a inibição da atividade enzimática da GR por tBHQ, com uma análise *in vitro* tanto para amostras de brânquia de ostra como da própria GR comercial.

✓ Apesar de tBHQ ser conhecida por seu efeito protetor, mediado pela ativação da transcrição de Nrf2 e subsequente proteção antioxidante, o pré-tratamento com tBHQ 30 μ M não foi capaz de reverter a mortalidade das ostras causadas por CHP.

Uma dificuldade encontrada está relacionada a falta de ferramentas metodológicas para o estudo de bivalves, tais como anticorpos comerciais, sequências completas dos genes e disponibilidade de RNA de interferência. Assim, os estudos moleculares não puderam ser aprofundados.

Ao tratarmos as ostras *C. gigas* com curcumina ou tBHQ, encontramos uma atividade antioxidante e aumento nos níveis relativos do mRNA de vários genes controlados por Nrf2. Assim como Nrf2, seu regulador negativo Keap1, não teve seus níveis de mRNA alterados. Normalmente, estes níveis de expressão são diminuídos quando a expressão e atividade de Nrf2 são induzidas. Entretanto, nossos estudos indicam que Nrf2 e Keap1 são conservados em ostras. Keap1 apresentou um alto grau de homologia a espécies selecionadas de moluscos e vertebrados, incluindo a presença de cisteínas redox-sensíveis que são cruciais para sua função. A forte amplificação das defesas antioxidantes dependentes da ativação do Nrf2, tanto no caso da curcumina, como da tBHQ, aliando a conservação de domínios do Nrf2 e do Keap1, indicam que a via ARE/Nrf2 é possivelmente funcional em bivalves.

Nosso estudo é o primeiro em investigar a via Nrf2/ARE em bivalves, fornecendo novas informações que possivelmente permitirão estudos mecanísticos sobre estresse oxidativo e eventos de biotransformação em invertebrados. Acreditamos que este simples protocolo experimental seja reprodutível, como apresentado aqui, e que poderá ser usado como uma nova ferramenta para investigar mecanismos envolvidos na resposta antioxidante e funcionalidade em bivalves.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I. et al. Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury--organ specificities and age effect. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 103, n. 3–4, p. 150–158, jun. 2011.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 373–382, 1981.

AMARAL, V. S. D.; SIMONE, L. R. L. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 94, n. 4, p. 811–836, jun. 2014.

ANAND, P. et al. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 1 dez. 2007.

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic Biology**, v. 55, n. 4, p. 539–552, ago. 2006.

ATKINSON, H. J.; BABBITT, P. C. Glutathione Transferases Are Structural and Functional Outliers in the Thioredoxin Fold. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11108–11116, 24 nov. 2009.

BAINY, A. C. D. et al. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1–5, p. 411–416, jul. 2000.

BEBIANNO, M. J. et al. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. **Biomarkers**, v. 9, n. 4–5, p. 305–330, 1 out. 2004.

BENEŠ, H. et al. Protection from oxidative and electrophilic stress in the Gsta4-null mouse heart. **Cardiovascular toxicology**, v. 13, n. 4, dez. 2013.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, ago. 1999.

BOTT, L. C. et al. A small-molecule Nrf1 and Nrf2 activator mitigates polyglutamine toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy. **Human Molecular Genetics**, p. ddw073, 8 mar. 2016.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p. 147–157, 31 mar. 2004.

BROKKEN, L. J. S.; GIWERCMAN, Y. L. Gene-environment interactions in male reproductive health: special reference to the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 89–96, fev. 2014.

BRYAN, H. K. et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 705–717, 15 mar. 2013.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CARMONA-APARICIO, L. et al. Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18348–18367, 7 ago. 2015.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 4, p. 540–552, abr. 2000.

CHÂTEL, A. et al. Genotoxicity assessment and detoxification induction in *Dreissena polymorpha* exposed to benzo[a]pyrene. **Mutagenesis**, v. 27, n. 6, p. 703–711, nov. 2012.

CHEN, X.; GUO, C.; KONG, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 7, n. 5, p. 376–385, 15 fev. 2012.

CHEVENET, F. et al. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 439, 2006.

CIDASC - Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina., [s.d.]. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2016/11/16/maricultores-discutem-servico-de-inspecao-para-ostras-mexilhoes-e-mariscos/>>. Acesso em: 1 fev. 2017

CLARK, R. A. Activation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. Supplement 2, p. S309–S317, 3 jan. 1999.

CLEASBY, A. et al. Structure of the BTB Domain of Keap1 and Its Interaction with the Triterpenoid Antagonist CDDO. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98896, 4 jun. 2014.

COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 95, p. 27–42, jun. 2016a.

COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 95, p. 27–42, jun. 2016b.

CUI, H. et al. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging, Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. **Journal of Signal Transduction, Journal of Signal Transduction**, v. 2012, 2012, p. e646354, 2 out. 2011.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Cellular functions of glutathione. v. 1830, n. 5, p. 3217–3266, maio 2013.

DEREEPER, A. et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server issue, p. W465–469, 1 jul. 2008.

DHEILLY, N. M. et al. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. **BMC Genomics**, v. 12, p. 468, 2011.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T. et al. An exceptionally potent inducer of cytoprotective enzymes: elucidation of the structural features that determine inducer potency and reactivity with Keap1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33747–33755, 29 out. 2010.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin—From Molecule to Biological Function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 29 maio 2012.

Estatísticas da aquicultura | Epagri. , [s.d.]. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=676>. Acesso em: 27 ago. 2016

FAO Fisheries & Aquaculture - Cultured Aquatic Species Information Programme - Crassostrea gigas (Thunberg, 1793). Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en>. Acesso em: 7 jul. 2016.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466–488, 27 jan. 2014.

FRANTZEN, M. et al. Biological effects of mechanically and chemically dispersed oil on the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 95–107, maio 2016.

FULDA, S. et al. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death, Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. **International Journal of Cell Biology, International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010, p. e214074, 21 fev. 2010.

GACESA, R. et al. Rising levels of atmospheric oxygen and evolution of Nrf2. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27740, 14 jun. 2016.

GÉRET, F. et al. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). **Aquatic Living Resources**, v. 15, n. 1, p. 61–66, mar. 2002.

glutathione S-transferase and crassostrea gigas - Gene - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=glutathione+S-transferase+and+crassostrea+gigas>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

glutathione S-transferase and Homo sapiens - Gene - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=glutathione+S-transferase+and+Homo+sapiens>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787–809, 15 fev. 2008.

GUERRERO-BELTRÁN, C. E. et al. Tert-Butylhydroquinone pretreatment protects kidney from ischemia-reperfusion injury. **Journal of Nephrology**, v. 25, n. 1, p. 84–89, 2012.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696–704, out. 2003.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 218–231, 1981.

HAHN, M. E. et al. The transcriptional response to oxidative stress during vertebrate development: effects of tert-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **PloS One**, v. 9, n. 11, p. e113158, 2014.

HAHN, M. E. et al. Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights from studies in zebrafish (*Danio rerio*). **Free Radical Biology and Medicine**, Nrf2 Regulated Redox Signaling and Metabolism in Physiology and Medicine. v. 88, Part B, p. 275–289, nov. 2015a.

HAHN, M. E. et al. Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights from studies in zebrafish (*Danio rerio*). **Free Radical Biology and Medicine**, Nrf2 Regulated Redox Signaling and Metabolism in Physiology and Medicine. v. 88, Part B, p. 275–289, nov. 2015b.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 6 jan. 2006.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51–88, 2005.

HAYTON, W. L.; BARRON, M. G. Rate-limiting barriers to xenobiotic uptake by the gill. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 151–157, 1 fev. 1990.

HE, S. et al. Effects of dietary tert-butylhydroquinone on domoic acid metabolism and transcription of detoxification-related liver genes in red sea bream *Pagrus major*. **Chinese Science Bulletin**, v. 58, n. 16, p. 1906–1911, 2 mar. 2013.

HEISS, E. H. et al. Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression. **Redox Biology**, v. 1, p. 359–365, 2013.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: PH.D, K. B. S. (Ed.). **Functional Metabolism**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2004. p. 319–368.

HUANG, W.; GU, Y.; NIU, H. Determination of tertiary-butylhydroquinone and its metabolites in rat serum by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. **Lipids**, v. 43, n. 3, p. 281–288, mar. 2008.

HUANG, Y. et al. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1401–1413, dez. 2015.

IMHOFF, B. R.; HANSEN, J. M. Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation. **Cell Biology and Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 541–551, dez. 2010.

JIMÉNEZ-OSORIO, A. S.; GONZÁLEZ-REYES, S.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Natural Nrf2 activators in diabetes. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 448, p. 182–192, 25 ago. 2015.

JINGJING, J. et al. Molecular characterization and expression analysis of a selenium dependent glutathione peroxidase on pearl oyster *Pinctada fucata*. **Journal of Fujian Agricultural and Forestry University**, 2010.

JO, P. G.; CHOI, Y. K.; CHOI, C. Y. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 147, n. 4, p. 460–469, maio 2008.

KADAM, P. V. et al. Development and validation of UV Spectrophotometric method for the estimation of Curcumin in cream formulation. **Pharmaceutical Methods**, v. 4, n. 2, p. 43–45, nov. 2013.

KALTHOFF, S. et al. Interaction between Oxidative Stress Sensor Nrf2 and Xenobiotic-activated Aryl Hydrocarbon Receptor in the Regulation of the Human Phase II Detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 5993–6002, 26 fev. 2010.

KANG, M.-I. et al. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2046–2051, 17 fev. 2004.

KASPAR, J. W.; NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1304–1309, 1 nov. 2009.

KEGG BRITE: Enzymes - *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext>. Acesso em: 12 jul. 2016.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 89–116, 2007.

KIM, J.; KEUM, Y.-S. NRF2, a Key Regulator of Antioxidants with Two Faces towards Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 2746457, 2016.

KOBAYASHI, M. et al. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 2, p. 493–502, jan. 2009.

LEICHERT, L. I.; JAKOB, U. Protein Thiol Modifications Visualized In Vivo. **PLOS Biol**, v. 2, n. 11, p. e333, 5 out. 2004.

LEUNG, P. S. C. et al. Environment and primary biliary cirrhosis: Electrophilic drugs and the induction of AMA. **Journal of Autoimmunity**, Special Issue: Epigenetics: The Host and the immune response in autoimmunity. v. 41, p. 79–86, mar. 2013.

LI, J. et al. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 83, n. 2, p. 313–328, fev. 2005.

LI, L. et al. Molecular Evolution of Keap1 TWO Keap1 MOLECULES WITH DISTINCTIVE INTERVENING REGION STRUCTURES ARE CONSERVED AMONG FISH. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3248–3255, 8 fev. 2008.

LI, Y. et al. Curcumin attenuates glutamate neurotoxicity in the hippocampus by suppression of ER stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in a manner dependent on AMPK. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 286, n. 1, p. 53–63, 1 jul. 2015.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LOBODA, A. et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1–27, 21 abr. 2016.

LÜCHMANN, K. H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 105, n. 3–4, p. 652–660, out. 2011.

LÜCHMANN, K. H. et al. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324–334, jul. 2014.

LUCKENBACH, T.; EPEL, D. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 6, p. R1919–R1929, 1 jun. 2008.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 17 jan. 2011.

MA, Q.; HE, X. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 1055–1081, out. 2012.

MACÍAS-MAYORGA, D. et al. Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the Mollusc *Crassostrea angulata*? **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 161, p. 231–241, abr. 2015.

MAHER, J.; YAMAMOTO, M. The rise of antioxidant signaling—The evolution and hormetic actions of Nrf2. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Nrf2 in Toxicology and Pharmacology, v. 244, n. 1, p. 4–15, 1 abr. 2010.

MANDUZIO, H. et al. The point about oxidative stress in molluscs. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, n. 2, p. 91–104, 1 jul. 2005.

MANJU, M.; AKBARSHA, M. A.; OOMMEN, O. V. In vivo protective effect of dietary curcumin in fish *Anabas testudineus* (Bloch). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 309–318, abr. 2012.

MARIA, V. L.; SANTOS, M. A.; BEBIANNO, M. J. Biomarkers of damage and protection in *Mytilus galloprovincialis* cross transplanted in Ria Formosa Lagoon (Portugal). **Ecotoxicology (London, England)**, v. 18, n. 8, p. 1018–1028, nov. 2009.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 1–2, p. 75–88, fev. 2005.

MAZALEUSKAYA, L. L. et al. PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 25, n. 8, p. 416–426, ago. 2015.

MENG, J. et al. Comparative analysis of oyster (*Crassostrea gigas*) immune responses under challenge by different *Vibrio* strains and conditions. **Molluscan Research**, v. 35, n. 1, p. 1–11, 2 jan. 2015.

NAUSER, T.; KOPPENOL, W. H.; SCHÖNEICH, C. Protein thiyl radical reactions and product formation: a kinetic simulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 80, p. 158–163, mar. 2015.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 1 dez. 2001.

nuclear factor erythroid 2-related factor and crassostrea gigas - Gene - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=nuclear+factor+erythroid+2-related+factor+and+crassostrea+gigas>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

OOI, N. et al. Antibacterial activity and mode of action of tert-butylhydroquinone (TBHQ) and its oxidation product, tert-butylbenzoquinone (TBBQ). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkt030, 5 mar. 2013.

PACKER, L.; WEBER, S. U.; RIMBACH, G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 2, p. 369S–73S, fev. 2001.

PAN, M.-H.; HUANG, T.-M.; LIN, J.-K. Biotransformation of Curcumin Through Reduction and Glucuronidation in Mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 4, p. 486–494, 4 jan. 1999.

PASSAIA, G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. **Plant Science**, v. 234, p. 22–26, maio 2015.

PAULILO, M. I. S. Maricultura e território em Santa Catarina - Brasil. **Geosul**, v. 17, n. 34, p. 87–112, 1 jan. 2002.

PAVLOVIĆ, S. Z. et al. Seasonal variations of the activity of antioxidant defense enzymes in the red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 413–428, 2010.

PESSATTI, T. B. et al. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 172–180, set. 2016.

PETERS, M. M. et al. Glutathione conjugates of tert-butyl-hydroquinone, a metabolite of the urinary tract tumor promoter 3-tert-butyl-hydroxyanisole, are toxic to kidney and bladder. **Cancer Research**, v. 56, n. 5, p. 1006–1011, 1 mar. 1996.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association**, v. 46, n. 1, p. 2–18, jan. 2014.

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signaling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, maio 2012.

REISCHL, E. et al. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 146, n. 1–2, p. 22–53, ago. 2007.

REQUEJO, R. et al. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. **The Febs Journal**, v. 277, n. 6, p. 1465–1480, mar. 2010.

ROBINSON, T. B. et al. Naturalized populations of oysters, *Crassostrea gigas* along the south african coast: distribution, abundance and population structure. **Journal of Shellfish Research**, v. 24, n. 2, p. 443–450, 1 ago. 2005.

SANIDAD, K. Z. et al. Oxidative Conversion Mediates Antiproliferative Effects of tert-Butylhydroquinone: Structure and Activity Relationship Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 19, p. 3743–3748, 18 maio 2016.

SATOH, T.; MCKERCHER, S. R.; LIPTON, S. A. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 645–657, dez. 2013.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et AL.]**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, jul. 2005.

SERRANO, M. A. S. et al. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 22, p. 17375–17385, nov. 2015.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. Pt 1, p. 1–16, 15 nov. 2001.

SINGHAL, S. S. et al. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 361–370, 15 dez. 2015.

SIRMALI, R. et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role on pulmonary contusion experimental model. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 44, n. 6, p. 905–913, 2014.

SMITH, A. J. et al. MDR3 P-glycoprotein, a Phosphatidylcholine Translocase, Transports Several Cytotoxic Drugs and Directly Interacts with

Drugs as Judged by Interference with Nucleotide Trapping. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23530–23539, 8 abr. 2000.

STAAB, T. A. et al. The conserved SKN-1/Nrf2 stress response pathway regulates synaptic function in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003354, mar. 2013.

STEGEMAN, J. J.; TEAL, J. M. Accumulation, release and retention of petroleum hydrocarbons by the oyster *Crassostrea virginica*. **Marine Biology**, v. 22, n. 1, p. 37–44, 1 set. 1973.

SUN, J.; REN, X.; SIMPKINS, J. W. Sequential Upregulation of Superoxide Dismutase 2 and Heme Oxygenase 1 by tert-Butylhydroquinone Protects Mitochondria during Oxidative Stress. **Molecular Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 437–449, 9 jan. 2015.

TEBAY, L. E. et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. **Free radical biology & medicine**, v. 88, n. 0 0, p. 108–146, nov. 2015.

TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. **Free radical biology & medicine**, v. 43, n. 1, p. 4–15, 1 jul. 2007.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343–1374, ago. 2008.

TREVISAN, R. et al. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. **Aquatic Toxicology**, Proceedings from the 16th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO16). v. 108, p. 85–93, fev. 2012.

TREVISAN, R. et al. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 159, p. 22–30, jan. 2014a.

TREVISAN, R. et al. Gills are an initial target of zinc oxide nanoparticles in oysters *Crassostrea gigas*, leading to mitochondrial disruption and oxidative stress. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 153, p. 27–38, ago. 2014b.

TREVISAN, R. et al. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Absorption, metabolism and excretion of a model electrophile. **Aquatic Toxicology**, v. 173, p. 105–119, abr. 2016a.

TREVISAN, R. et al. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Absorption, metabolism and excretion of a model electrophile. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 173, p. 105–119, abr. 2016b.

TURLEY, A. E.; ZAGORSKI, J. W.; ROCKWELL, C. E. The Nrf2 activator tBHQ inhibits T cell activation of primary human CD4 T cells. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 289–295, fev. 2015.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, fev. 2003.

VAREED, S. K. et al. Pharmacokinetics of Curcumin Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 17, n. 6, p. 1411–1417, jun. 2008.

WANG, Y.-J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867–1876, ago. 1997.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

WILLIAMS, L. M. et al. Developmental Expression of the Nfe2-Related Factor (Nrf) Transcription Factor Family in the Zebrafish, *Danio rerio*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e79574, 24 out. 2013.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, n. 5, p. 549–561, 1 set. 2008.

XU, H.-J. et al. Dietary vitamin C deficiency depresses the growth, head kidney and spleen immunity and structural integrity by regulating NF- κ B, TOR, Nrf2, apoptosis and MLCK signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 52, p. 111–138, maio 2016.

YAN, D. et al. Induction of the Nrf2-driven antioxidant response by tert-butylhydroquinone prevents ethanol-induced apoptosis in cranial neural crest cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 144–149, 1 jul. 2010.

YE, Z.-W. et al. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Redox regulation of differentiation and de-differentiation. v. 1850, n. 8, p. 1607–1621, ago. 2015.

ZAGORSKI, J. W. et al. The Nrf2 activator, tBHQ, differentially affects early events following stimulation of Jurkat cells. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 136, n. 1, p. 63–71, nov. 2013.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196–198, jul. 2008.

ZENG, L. et al. The role of Nrf2/Keap1 signaling in inorganic mercury induced oxidative stress in the liver of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 345–352, out. 2016.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49–54, 4 out. 2012.

ZHANG, G. et al. Molecular Basis for Adaptation of Oysters to Stressful Marine Intertidal Environments. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 357–381, 2016.

ZHU, H. et al. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. **FEBS letters**, v. 579, n. 14, p. 3029–3036, 6 jun. 2005.

ZIMNIAK, P. Relationship of electrophilic stress to aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 6, p. 1087–1105, 15 set. 2011.

ZOU, Y. et al. Expression profile of eight glutathione S-transferase genes in *Crassostrea ariakensis* after exposure to DSP toxins producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. **Toxicon**, v. 105, p. 45–55, out. 2015.

ANEXO A

ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DO
DOUTORADO 2013.1 – 2017.1*Artigos completos publicados em periódicos*

Acosta, D. da S., **Danielle, N.M.**, Altenhofen, S., Luzardo, M.D., Costa, P.G., Bianchini, A., Bonan, C.D., da Silva, R.S., Dafre, A.L., 2016. Copper at low levels impairs memory of adult zebrafish (*Danio rerio*) and affects swimming performance of larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 185–186, 122–130. doi:10.1016/j.cbpc.2016.03.008

Trevisan, R., Mello, D.F., Delapiedra, G., Silva, D.G.H., Arl, M., **Danielli, N.M.**, Metian, M., Almeida, E.A., Dafre, A.L., 2016. Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Absorption, metabolism and excretion of a model electrophile. *Aquat. Toxicol.* 173, 105–119. doi:10.1016/j.aquatox.2016.01.008

Danielli, N.M., Trevisan, R., Mello, D.F., Fischer, K., Deconto, V.S., Acosta, D. da S., Bianchini, A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., 2017. Upregulating Nrf2-dependent antioxidant defenses in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Investigating the Nrf2/Keap1 pathway in bivalves. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* in press, 1–10.

Resumos publicados em anais de congressos

DANIELLE, Naissa M.; FISCHER, K.; MELLO, D. F.; TREVISAN, R.; MASCARENHAS, E.; ESPÍNDOLA, L.; DAFRE, A. L. Curcumin induces glutathione/glutathione s-transferase system in gills of pacific oysters *Crassostrea gigas*. In: SETAC Latin America 11TH Biennial Meeting, 2015, Buenos Aires/Argentina.

DANIELLI, Naissa M.; FISCHER, Kelvis; ESPÍNDOLA, Leandro; MELLO, Danielle Ferraz; DELAPEDRA, Gabriel; TREVISAN, Rafael; DAFRE, Alcir L. níveis de glutathione e indução de glutathione s-transferase em resposta a indutores clássicos da via do Nrf2/ARE em ostras do pacífico *Crassostrea gigas*. In: XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2014, Vitória/ES.

DANIELLI, Naissa M.; ACOSTA, Daiane S.; FISCHER, Kelvis; DELAPEDRA, Gabriel; DAFRE, Alcir L. Respostas Antioxidantes em ostras do Pacífico, *Crassostrea gigas* expostas a tert-butilhidroquinona (tBHQ), um Clássico Indutor da Via do Nrf2/ARE. In:II Simpósio de Integração das Pós-Graduações do CCB/UFSC, 2013, Florianópolis/SC.

ANEXO B

Artigo

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 195 (2017) 16–26



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc

Upregulating Nrf2-dependent antioxidant defenses in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Investigating the Nrf2/Keap1 pathway in bivalves



Naissa Maria Danielli ^{a,*}, Rafael Trevisan ^{a,1}, Danielle Ferraz Mello ^{a,2}, Kelvis Fischer ^a,
Vanessa Schadeck Deconto ^a, Daiane da Silva Acosta ^a, Adalto Bianchini ^b,
Afonso Celso Dias Bainy ^a, Alcir Luiz Dafre ^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil

^b Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil

DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.02.004

